

## *Rapport de stage de fin d'étude*

*Licence Sciences & Techniques*

«BioProcédés, Hygiène & sécurité alimentaires»

*Environnement de travail dans les laboratoires  
de microbiologie environnementale : Recherche  
des bactéries par écouvillonnage et boîte de  
contact*

**Réalisé par : Mlle. Benabboud Roua**

**Soutenu le : 06/06/2017**

**Devant le Jury composé de:**

- |                           |                  |
|---------------------------|------------------|
| • <b>Pr. L. AARAB</b>     | <b>Examineur</b> |
| • <b>Pr. S. ANANOU</b>    | <b>Encadrant</b> |
| • <b>Dr. A. EL OUARDI</b> | <b>Encadrant</b> |

*Année Universitaire : 2016-2017*

## *Dédicaces*

*Je* dédie ce travail au tout PUISSANT DIEU, sans qui je n'aurai pas l'inspiration et le pouvoir d'élaborer ce travail.

*Je* voudrais avoir une pensée à l'endroit de mes parents, Mme **F. Amara** et Mr **M. Benabboud** en signe de reconnaissance de l'immense soutien, tant au plan financier que moral. Recevez à travers ce travail, toute notre gratitude et nos profonds sentiments. Que Dieu le tout puissant soit à vos côtés et vous accorde une meilleure santé.

*Je* le dédie également à tous mes enseignants de la Faculté des Sciences et Techniques Fès, à mes encadrant Dr. **EL Ouardi Abdelmoula** et Pr. **Ananou Samir**, ainsi mes collègues qui m'ont beaucoup soutenus durant ce parcours de trois ans.

## *Remerciements*

J'aurais failli à la tradition si je n'associais pas à ce travail des remerciements aux nombreuses personnes et institutions qui ont contribué à sa réalisation et son aboutissement.

Je tiens tout d'abord à remercier, Monsieur **Achibat Taoufiq**, le Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques-Fès, pour m'avoir permis de suivre ma formation.

Monsieur, **Rhajaoui Mohammed**, Directeur de l'Institut National d'Hygiène, pour m'avoir accordé l'opportunité d'effectuer mon stage.

Je tiens à remercier vivement et à témoigner toute ma reconnaissance à mon encadrant, Monsieur le Docteur **EL Ouardi Abdelmoula**, Chef du Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire, à l'Institut National d'Hygiène, pour m'avoir soutenu, tout le long de ce travail qui lui est, également, dédié. J'ai eu le privilège de profiter de vos discussions enrichissantes et d'appliquer vos conseils précieux qui m'ont tellement servis et me serviront toujours. Je tiens à vous adresser toute ma gratitude.

Néanmoins, un remerciement particulier à Pr. **Ananou Samir**, mon Professeur et Encadrant de ce projet à qui je dois beaucoup d'estime et de respect pour accepter encadrer mon travail, pour son appui inestimable ainsi, pour sa disponibilité et son encadrement, qu'il veuille bien accepter le témoignage de notre reconnaissance.

Nous remercions respectueusement les membres du jury : le professeur **L. AARAB**, le Professeur. **Ananou Samir** le Docteur **EL Ouardi Abdelmoula**

*J*e saisi l'occasion pour exprimer mes remerciements aussi au personnel du Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire, à l'Institut National d'Hygiène pour l'accueil qu'elles m'ont réservé et pour les précieuses informations qu'elles m'ont prodigué avec intérêt et compréhension.

*V*euillez accepter mes plus vifs remerciements et sachez que je ne saurai jamais mesurer la grandeur de votre soutien et de vos conseils pertinents.

*A*insi mes sincères remerciements, vont aussi à tous ceux qui ont contribué à la mise en forme de ce travail, plus précisément El Houcine Ait-Ouakrim, Mohammed Amine Bahir, Zellou Mohammed Aymane. Veuillez trouver ici l'expression de mes vifs remerciements, pour le partage de votre expérience et l'expression de ma parfaite reconnaissance.

# Sommaire

<i>Présentation du lieu de stage</i> .....	8
<i>INTRODUCTION GENERALE</i> .....	1
ETUDE .....	3
BIBLIOGRAPHIQUE .....	3
CHAPITRE 1 : Ecouvillonnage des surfaces.....	4
I. Généralité sur l'écouvillonnage des surfaces.....	4
Chapitre 2 : Qualité bactériologiques des surfaces.....	6
I. Les bactéries contaminant les surfaces de travail.....	6
Partie expérimentale.....	7
Chapitre 1 : Matériel et méthodes.....	8
I. Présentation des sites de prélèvements .....	8
II. Milieux de culture.....	11
III. Méthodologie de prélèvement .....	11
IV. Dénombrement microbien.....	11
Chapitre 2 : Résultats et discussion.....	13
I. Résultats .....	13
II. Discussion .....	18
Conclusion et Recommandations.....	20
Références bibliographiques.....	21
Annexes .....	22

## *Liste des abréviations*

<b>N-D</b>	Nettoyage et Désinfection
<b>INH</b>	Institut National d'Hygiène
<b>MHA</b>	Microbiologie et Hygiène Alimentaire
<b>FMAT</b>	Flore Mésophile Aérobie Totale
<b>S.aureus</b>	Staphylococcus aureus
<b>BHI</b>	Brain Heart Infusion « Cœur de cervelle infusion »
<b>PCA</b>	Plate Count Agar
<b>BP</b>	Baird Parker
<b>UFC</b>	Unité Formant colonie
<b>A<sub>w</sub></b>	Activité de l'eau
<b>VRBL</b>	Milieu lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre
<b>MS</b>	Ministère de la santé
<b>IST</b>	Infection sexuellement transmissible

# *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1</b>	<i>Sites de prélèvements .....</i>	8
<b>Tableau 2</b>	<i>Prélèvements par écouvillonnage et micro-organismes recherché.....</i>	9
<b>Tableau 3</b>	<i>Dénombrement de la FMAT sur milieu PCA par écouvillonnage.....</i>	13
<b>Tableau 4</b>	<i>Dénombrement de la FMAT sur milieu TSA par boite de contact.....</i>	14
<b>Tableau 5</b>	<i>Dénombrement des CT sur milieu VRBL.....</i>	15
<b>Tableau 6</b>	<i>Dénombrement des CF sur milieu VRBL.....</i>	15
<b>Tableau 7</b>	<i>Dénombrement des Staphylococcus sur milieu Baird Parker.....</i>	16
<b>Tableau 8</b>	<i>Dénombrement des Staphylococcus sur milieu Baird Parker « à partir des boites de contact » .....</i>	17

## *Présentation du lieu de stage*

Ce stage s'est déroulé au sein du département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire de l'Institut National d'Hygiène (INH). Qui est établissement sous la tutelle du ministère de la santé. Inauguré le 30 décembre 1930 à Rabat dans le but de prendre en charge les problèmes d'hygiène et d'épidémiologie des maladies transmissibles du Maroc et de diffuser les notions élémentaires de l'hygiène et de la prophylaxie pour protéger la santé de la population.

L'INH de Rabat se caractérise par son champ d'intervention très vaste et ses nombreux laboratoires, ce qui lui permet d'agir en tant que support technique des différents programmes du Ministère de la santé (MS) tel que le programme santé-environnement, la tuberculose, le programme du paludisme, le programme du VIH (SIDA), le programme des infections sexuellement transmissibles (IST), le programme de la rougeole, etc.

En outre l'INH assure également le rôle d'expertise technique en matière d'hygiène alimentaire.

L'institut a pour mission aussi d'élaborer des normes en matière de biologie sanitaire et de développer et standardiser les techniques de référence à implanter dans les laboratoires du MS à l'échelle régionale ou provinciale.

Dans sa mission de surveillance, il établit selon l'approche d'évaluation des risques sanitaires liés aux denrées alimentaires et

# INTRODUCTION GENERALE

En laboratoire de microbiologie environnementale, les salles techniques peuvent être contaminées par des microorganismes provenant des échantillons (denrées alimentaires, eaux, conserves,) ou des cultures (moisissures, bactéries...) « 1 ».

En outre, certains agents biologiques peuvent être introduits involontairement dans les locaux par le biais d'objets (emballages, matériel de prélèvement...), ou encore de personnes (chaussures, vêtements...). Lorsque ces micro-organismes sont dispersés dans l'air (renversement accidentel d'un flacon, utilisation de vortex...), ils peuvent contaminer des surfaces même éloignées (meubles, sols, murs...). Ensuite, les micro-organismes prolifèrent lorsqu'ils trouvent des conditions favorables « 2 ».

Il convient donc de mettre en place des stratégies de nettoyage/ désinfection (N-D) en fonction des activités, des locaux, des surfaces ou encore d'événements exceptionnels contaminants. « 3 »

Ces stratégies donnent lieu à des procédures écrites et validées qui détaillent les techniques, les produits utilisés et les mesures de prévention à suivre par la personne effectuant cette intervention. Certaines interventions lourdes de désinfection (désinfection par voie aérienne) doivent être planifiées en fonction du niveau de contamination et être effectuées en l'absence de personnel « 4 ».

L'originalité de ce projet repose sur des études appliquées sur terrain afin de mieux évaluer la charge bactérienne au niveau des surfaces d'analyses au sein du laboratoire de microbiologie. Pour cela, nous allons quantifier ces populations bactériennes avant et après les opérations de N-D. D'autre part, l'application des conditions stressantes telles les opérations de N-D peuvent engendrer une baisse de la diversité microbienne.

Ce rapport s'articule en 3 parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique concernant d'une part les surfaces de travail et la source de contamination ainsi que les procédures de nettoyage-désinfection et d'autre part, les différentes méthodologies de prélèvement, de quantification et d'identification des bactéries de surfaces.

- L'ensemble des parties expérimentales concernant les différents protocoles utilisés dans ce projet sont présentés dans la seconde partie matériel et méthodes.

- La troisième partie est consacrée aux résultats de l'évaluation de la charge bactérienne des surfaces. Suivi d'une discussion des résultats obtenus. Les perspectives proposées pour compléter ce travail seront données dans la conclusion générale.

Pour mener ce travail, les objectifs suivant ont été fixés :

- Contrôler la qualité microbiologique des surfaces de travail au sein du laboratoire de microbiologie et hygiène alimentaire (MHA).

- Quantifier et qualifier la flore microbienne en se basant sur deux méthodes :  
écouvillonnage et boîte de contact.

*ETUDE*

*BIBLIOGRAPHIQUE*

---

## CHAPITRE 1 : *Écouvillonnage des surfaces*

### I. Généralité sur l'écouvillonnage des surfaces

#### Historique

##### 1. Les surfaces de travail

L'hygiène des surfaces inertes est une préoccupation constante. La contamination microbiologique des surfaces peut être apportée par la matière première, l'air, l'eau ou le personnel. L'adhésion des micro-organismes d'altération ou pathogènes sur les surfaces induit des effets néfastes à la fois en termes de qualité et de santé publique. « 5 »

Pour réduire la population microbienne des surfaces à un niveau tel que le risque de contamination du personnel ou des produits alimentaires à analysés soit acceptable, des procédures de N-D sont mises en œuvre dans les laboratoires.

Afin de vérifier la bonne application des opérations de N-D, des contrôles réguliers sont réalisés pour connaître et estimer la population microbienne résiduelle présente sur les surfaces. Cette procédure est d'ailleurs un outil important de la gestion de la qualité « 6 »

Malgré la mise en place de procédures agressives, le N-D ne permet pas l'élimination totale de la flore microbienne des surfaces ouvertes. Certaines bactéries pathogènes comme *Listeria monocytogenes* peuvent persister dans les locaux et ustensiles « 7 ». Lors des contrôles microbiologiques des surfaces, seule la fraction cultivable est dénombrée par les hygiénistes.

##### 2. Source de contamination

Les micro-organismes prolifèrent lorsqu'ils trouvent des conditions favorables. « 6 »

- Suffisamment de nourriture (poussière, dépôt de gras ...)
- Une humidité relative élevée entre (70% et 100%)
- Une température optimale de croissance pouvant varier selon les microorganismes.

Et en l'absence de nettoyage des surfaces, celles-ci sont colonisées par des populations très variées (bactéries, champignons, protozoaires...) cohabitant parfaitement sous forme de biofilm accroché aux micro-aspérités. Cette cohabitation se traduit de différentes façons :

- Les populations microbiennes superficielles, ainsi qu'une substance gélatineuse sécrétée par les micro-organismes, protègent physiquement les populations sous-jacentes.
- Certaines bactéries peuvent trouver refuge dans les protozoaires, profitant ainsi de leur résistance aux biocides (produit pouvant tuer les organismes nuisibles, nocifs ou gênants tels que les micro-organismes) « 9 ».
- Des interactions s'instaurent entre populations, certaines libérant des produits de dégradation dont se nourrissent les autres, certaines libérant des produits toxiques tuant les autres. Les bactéries peuvent également échanger des gènes de résistance aux biocides « 9 ».

### 3. Désinfection des surfaces

La désinfection des surfaces permet d'éliminer ou tuer uniquement les micro-organismes présents au moment d'emploi préalable au moyen d'un détergent. Toutefois, il existe des produits couplant les activités détergentes et désinfectantes. Ils peuvent être employés dans les laboratoires où les surfaces ne présentent pas un grand degré de salissure « 10 ».

Ces produits ne nécessitent pas de rinçage, mais peuvent, à la longue, laisser des dépôts. Pour les éliminer, il convient de procéder, une fois par semaine, à un nettoyage avec un détergent, suivi d'un rinçage et d'une application de désinfectant. « 11 »

### 4. Différentes méthodologies de prélèvement

Il existe principalement deux types de méthode pour détecter les microorganismes présents sur une surface :

#### *a) Technique d'écouvillonnage*

Cette technique présente l'avantage de permettre des prélèvements dans des endroits peu accessibles aussi bien que sur les surfaces planes. L'écouvillonnage est à conseiller pour une recherche qualitative des espèces contaminants.

#### *b) Technique d'impression sur gélose « Boite de contact »*

Ce procédé reste le plus pratique, le plus rapide et le plus employé. Il nécessite l'emploi de boîte contact contenant un milieu gélosé qui forme un ménisque en surface : boîte Rodac, le couvercle repose sur un épaulement et ne touche donc pas la surface de la gélose. Pour un contrôle de surface après désinfection, il est recommandé d'utiliser un milieu gélosé neutralisant l'activité des désinfectants.

## *Chapitre 2 : Qualité bactériologiques des surfaces*

### **I. Les bactéries contaminant les surfaces de travail**

#### *Flore mésophile aérobie totale (FMAT)*

La flore aérobie mésophile aussi appelée flore totale, représente l'ensemble des microorganismes se développant en présence d'oxygène à une température optimale de 30°C (multiplication active de 10°C à 45°C). Cette appellation peut donc regrouper aussi bien des microorganismes pathogènes que d'altération. « 12 ».

#### ➤ Rôle en matière d'hygiène

Bien que, pour la plupart des espèces, ces bactéries ne soient pas dangereuses pour la santé, leur détection traduit une altération

Ce critère traduit l'hygiène générale de fabrication : microorganismes tests d'hygiène. Une flore aérobie mésophile importante traduit en général :

#### ➤ Une mauvaise qualité microbiologique générale

Un nombre élevé de flore aérobie mésophile représente un risque de présence de germes pathogènes, à des niveaux pouvant être dangereux

Une étude a montré que malgré l'absence de corrélation directe entre le nombre de mésophiles et le nombre de pathogènes, il est constaté que le nombre de pathogènes ne se manifeste que pour une flore totale élevée. « 13 »

L'étude de la flore totale est donc un outil permettant de garantir une certaine sécurité hygiénique.

# *Partie expérimentale*

---

## Chapitre 1 : Matériel et méthodes

### I. Présentation des sites de prélèvements

Pour la réalisation de cette étude, des prélèvements ont été effectués de façon aléatoire sur différents points d'usage au sein de laboratoire de microbiologie et hygiène alimentaire.

Ces sites de prélèvement ont été retenues en fonction du :

- Degré de contamination initial
- Accessibilité au N-D « nettoyage-désinfection »
- L'équipement des salles du département

Ces prélèvements ont été réalisés chaque semaine et effectués par des écouvillons et des boites de contact à partir de différents lieux, surfaces, installations « voir tableau ci-dessous » :

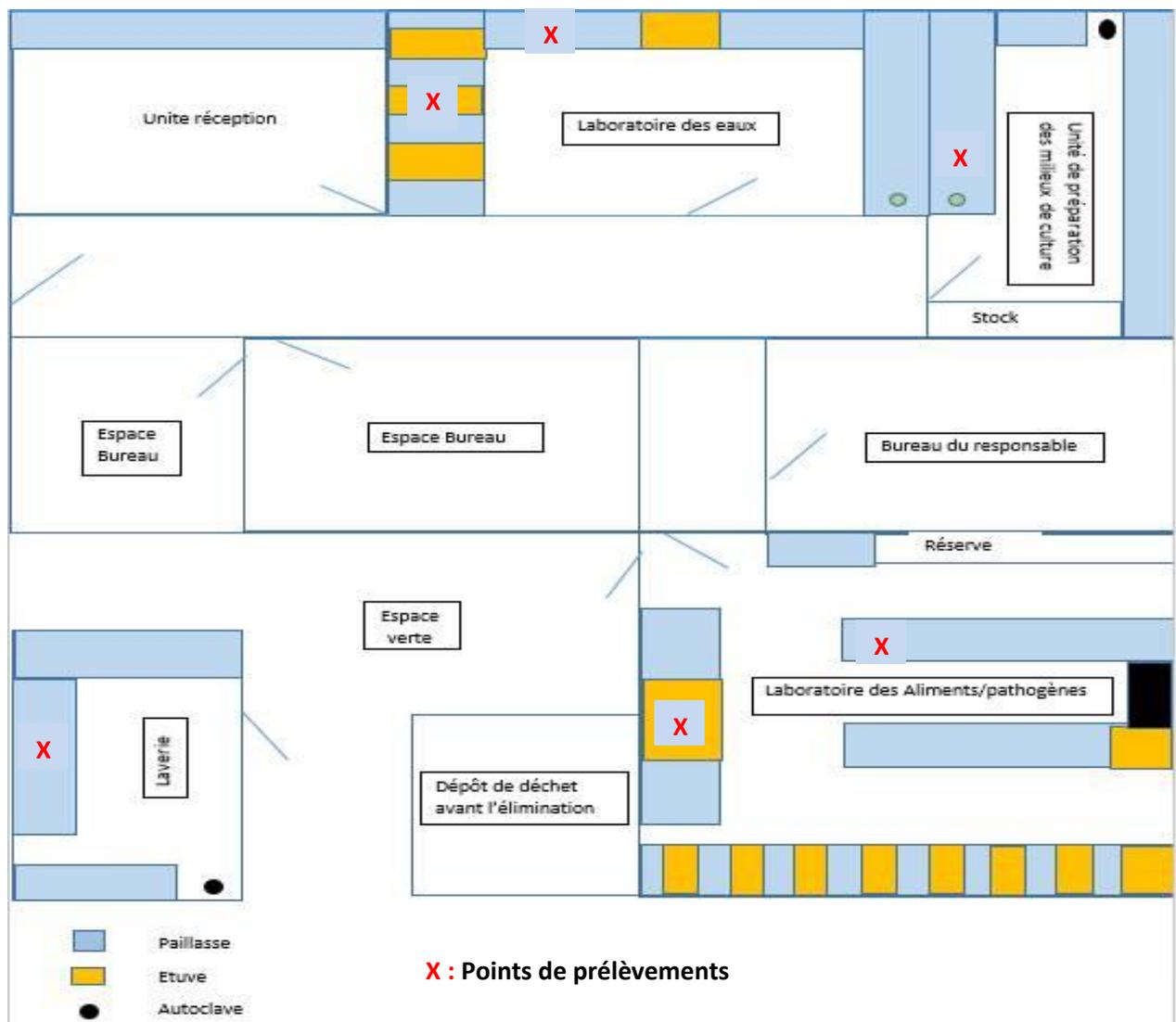


Figure 1 : Organigramme de laboratoire de microbiologie et hygiène alimentaire avec les différents points de prélèvements.

**Tableau 1 : Sites de prélèvements**

Unités	Activités	
Analyses bactériologiques des eaux	Analyse microbiologique des eaux traitées (Eau de robinet, eaux de piscine, eaux minérales ...) et non traitées (eau de plage, des puits, eaux usées, eaux de sources, eaux thermales...).	
Analyses bactériologiques des aliments	Analyses microbiologiques des aliments, des produits laitiers, des œufs liquides, des conserves, des semi conserves, des charcuteries, des intoxications et l'identification des souches bactériennes.	
Préparation des milieux de cultures	Chargée de la préparation de tous les milieux concernant la recherche bactérienne dans les eaux et les aliments.	
Laverie	Chargée du lavage et stérilisation du matériel	

**Tableau 2 : Prélèvements par écouvillonnage et micro-organismes recherchés**

<i>Origine du prélèvement</i>	<i>Nombre d'échantillon</i>	<i>Prélèvement</i>	<i>Flores recherchés</i>
Surface de la paillasse des eaux	3	Paillasse de filtration des eaux « prélèvement par écouvillonnage » : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avant désinfection</li> <li>- Après désinfection par l'eau de javel dilué 1/10</li> <li>- Après désinfection par bactéricide</li> <li>- Avant manipulation</li> <li>- Après manipulation</li> </ul>	FMAT
Surface de la paillasse des aliments	3	Paillasse de manipulation « prélèvement par écouvillonnage » : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avant désinfection</li> <li>- Après désinfection par l'eau de javel dilué 1/10</li> <li>- Après désinfection par bactéricide</li> <li>- Avant manipulation</li> <li>- Après manipulation</li> </ul>	Staphylocoque
Laverie	3	Surface de lavage du matériel « prélèvement par boîte de contact » : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avant désinfection</li> <li>- Après désinfection par l'eau de javel dilué 1/10</li> </ul>	
Surface préparation des milieux	3	Surface de préparation des milieux de cultures « prélèvement par boîte de contact » : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avant désinfection</li> <li>- Après désinfection par l'eau de javel dilué 1/10</li> </ul>	
Etuve 37°C « Aliments »	3	« Prélèvement par écouvillonnage » : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avant désinfection</li> <li>- Après désinfection par l'eau de javel dilué 1/10</li> <li>- Après désinfection par bactéricide</li> <li>- Avant manipulation</li> <li>- Après manipulation</li> </ul>	Coliformes fécaux et totaux
Etuve 36°C « eau »	3	« Prélèvement par boîte de contact » : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avant désinfection</li> <li>- Après désinfection par l'eau de javel dilué 1/10</li> </ul>	
Chariot	3	« Prélèvement par boîte de contact » : <ul style="list-style-type: none"> <li>- Avant désinfection</li> <li>- Après désinfection par l'eau de javel dilué 1/10</li> </ul>	Pseudomonas

<b>Total</b>	<b>21</b>	
--------------	-----------	--

## **II. Milieux de culture**

Les milieux de culture utilisés sont cités dans l'annexe.

## **III. Méthodologie de prélèvement**

### 1. Technique d'écouvillonnage

Ce mode de prélèvement est utilisé pour les zones favorables à la prolifération des bactéries pathogènes « surfaces et installations ». Cette technique présente l'avantage de permettre des prélèvements dans des endroits peu accessibles aussi bien que sur les surfaces planes. L'écouvillonnage est à conseiller pour une recherche qualitative des espèces contaminants.

Après que la surface à échantillonner est définie « par 30 cm<sup>2</sup> », le prélèvement s'effectue par un frottement pendant au moins 20 secondes avec un écouvillon stérile en faisant des stries parallèles, rapprochées, tout en tournant lentement et en répétant ce prélèvement en perpendiculaire.

L'écouvillon est introduit ensuite dans un volume spécifié de liquide « BHI ». Après agitation on ensemence dans le milieu correspondant.

### 2. Technique de boîte de contact

La surface de gélose de la boîte de contact a été pressée fermement contre la surface d'essai pendant 10s, sans décrire de mouvement latéral. D'après la littérature, on sait que les meilleurs résultats obtenus avec les boîtes de contact nécessitent un temps de contact de 10s et une pression telle que celle exercée par une masse de 500 g. Ensuite, les boîtes de contact ont été fermées immédiatement après l'ensemencement et finalement incubées à 36±1°C pendant 18h à 24h.

## **IV. Dénombrement microbien**

Dans le cadre de la détection de différentes sources possibles de la contamination bactérienne dans les salles de laboratoire MHA, plusieurs analyses microbiologiques ont été réalisées pour mettre en évidence la FMAT, Staphylocoques, coliformes et *Pseudomonas*.

### a) Recherche et dénombrement de la FMAT

Pour le dénombrement de la FMAT, 1 ml de la suspension mère a été mis sur une boîte de pétri stérile, puis 15 ml du milieu PCA ont été ajoutés. Le tout a été mélangé doucement puis incubé à 36±1°C pendant 18h à 24h. Le principe d'utilisation de ce milieu gélosé repose sur

la présence du glucose comme source de carbone, de l'hydrolysate tryptique de caséine comme substance nutritive et l'extrait de levure en tant que facteur de croissance.

b) Dénombrement des *Staphylococcus*

Pour la recherche des *Staphylococcus* le milieu gélosé sélectif Baird Parker a été choisi, coulé après préparation dans des boîtes de pétri stériles.

A partir de la solution mère, un étalement en surface de ces boîtes de pétri a été réalisé. Les colonies de *Staphylococcus aureus* caractéristiques sont noires, brillantes d'un diamètre 0,5 et 2 mm et entourées d'un liséré blanc opaque et d'une zone claire, les colonies de *Staphylococcus* blanc sont grises.

c) Dénombrement de *Pseudomonas*

Pour le dénombrement de *Pseudomonas* on procède de la même manière que celle de *Staphylococcus*, En effet, 0,1 ml de la suspension mère a été étalé sur le milieu Cétrimide, puis incubé à  $42 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant 18 à 24h.

d) Dénombrement des coliformes

La recherche des coliformes a englobé les coliformes totaux et fécaux. Le dénombrement a été réalisé en ensemençant 1 ml de la suspension mère par incorporation au milieu VRBL. L'incubation des CT se fait à  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ , et celle des CF se fait à  $44 \pm 1^\circ\text{C}$ , pendant 18 à 24h.

## Chapitre 2 : Résultats et discussion

La présente étude a porté sur la caractérisation bactériologique des échantillons prélevés auprès de quatre salles du laboratoire MHA dans sept surfaces différentes. Les prélèvements ont été réalisés avant la désinfection de la paillasse, avant manipulation qui englobe l'ensemble des prélèvements effectués après la désinfection de la paillasse par bactéricide et par eau de javel diluée 1/10, et après manipulation « prélèvements réalisés avant la désinfection de la paillasse ».

**N.B :** Tous les prélèvements ont été réalisés à partir des mêmes points pour chaque laboratoire. Les résultats présentés ci-dessus représentent la moyenne des trois échantillons pour chaque paillasse.

### I. Résultats

#### 1. Dénombrement des FMAT :

La flore mésophile aérobie totale est considérée comme étant des germes aérobies pouvant se multiplier dans des conditions ambiantes à 30 °C et ne constituant pas une famille bactérienne particulière. Cette flore regroupe des *Enterobacteriaceae*, de *Bacillus*, de Staphylocoques, de *Pseudomonas*, des Bactéries lactiques ou d'autres agents éventuellement pathogènes.

Leur présence au-delà des limites définies peut signifier un défaut d'hygiène.

Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale se fait par culture sur le milieu sélectif gélosé PCA, et varie considérablement entre les différentes surfaces étudiées. Le tableau ci-dessous représente le taux des FMAT dans les échantillons.

**Tableau 3 : Dénombrement de la FMAT sur milieu PCA par écouvillonnage**

Lieu de prélèvement	Nature d'échantillon	Stade de prélèvement				Seuil
		Avant désinfection	Avant manipulation		Après manipulation	
Après désinfection eau de javel 1/10	Après désinfection bactéricide					
Surface d'environnement de travail	Laboratoire des eaux	1000	20	-	140	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Laboratoire de microbiologie alimentaire	667	7	4	10	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
Equipement	Etuve "labo aliment" 36 ±1°C	800	-	-	60	>10 UFC/cm <sup>2</sup>

Les résultats de dénombrement de la FMAT au niveau du laboratoire des eaux, des aliments et l'étuve avant désinfection ont montré une non-conformité de 1000 UFC/cm<sup>2</sup>, 667 UFC/cm<sup>2</sup> et 800 UFC/cm<sup>2</sup> respectivement. Ces valeurs ont été diminuées à 140 UFC/cm<sup>2</sup>, 10 UFC/cm<sup>2</sup> et 60 UFC/cm<sup>2</sup> respectivement dans les trois sites après la manipulation.

La désinfection à l'aide d'un bactéricide et de l'eau de javel montre une conformité significative.

Au regard des résultats présentés, il paraît que la totalité des prélèvements des surfaces « les surfaces d'environnement de travail au sein du laboratoire des eaux et de laboratoire de microbiologie alimentaire, ou équipement », présentent de point de vue d'altération charge élevée de la flore mésophile aérobie total dont le taux de contamination dépasse la norme en vigueur « 10 UFC/cm<sup>2</sup> ».

**Tableau 4 : Dénombrement de la FMAT sur milieu TSA par boîte de contact**

Lieu de prélèvement	Nature d'échantillon	Stade de prélèvement		Seuil
		Avant désinfection En UFC/cm <sup>2</sup>	Après désinfection eau de javel 1/10 En UFC/cm <sup>2</sup>	
Surface d'environnement de travail	Laboratoire des eaux	10	-	=10 UFC/cm <sup>2</sup>
		Incomptable	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Surface de préparation des milieux de culture	35	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Surface de laverie	45	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
Equipement	Etuve « labo eau » 36 ±1°C	60	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Chariot de ramassage des échantillons analysés	58	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>

Concernant les résultats d'analyses des prélèvements par boîte de contact en remarque que seule la surface d'environnement de travail du laboratoire des eaux avant désinfection qui renferme une charge tolérable de la flore total « 10 UFC/cm<sup>2</sup> », les autres sites de prélèvements sont trop chargés.

## 2. Dénombrement des coliformes fécaux et totaux :

Les coliformes sont des bactéries recherchées dans les surfaces, les aliments etc., car ils sont des témoins de la qualité hygiénique non satisfaisante et des conditions d'hygiène insuffisantes. Leur présence peut être une indication d'une contamination fécale.

Les résultats de dénombrement des coliformes fécaux et totaux de la présente étude sont représentés dans les tableaux 5 et 6.

**Tableau 5 : Dénombrement des CT sur milieu VRBL**

Lieu de prélèvement	Nature d'échantillon	Stade de prélèvement				Seuil
		Avant désinfection	Avant manipulation		Après manipulation	
	Après désinfection eau de javel 1/10		Après désinfection bactéricide			
Surface d'environnement de travail	Laboratoire des eaux	70	15	6	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Laboratoire de microbiologie alimentaire	200	80	9	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
Equipement	Etuve "labo aliment" 36 ±1°C	23	-	-	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>

Les surfaces analysées avant manipulation et avant désinfection sont chargés en Coliformes Totaux 70 UFC/cm<sup>2</sup>, 200 UFC/cm<sup>2</sup> et 23 UFC/cm<sup>2</sup>. Pour le laboratoire de microbiologie alimentaire cette charge diminue respectivement après la désinfection jusqu'à 80 UFC/cm<sup>2</sup>, 9 UFC/cm<sup>2</sup> et 0 UFC/cm<sup>2</sup>.

**Tableau 6 : Dénombrement des CF sur milieu VRBL**

Lieu de prélèvement	Nature d'échantillon	Stade de prélèvement				Seuil
		Avant désinfection	Avant manipulation		Après manipulation	
	Après désinfection eau de javel 1/10		Après désinfection bactéricide			
Surface d'environnement de travail	Laboratoire des eaux	11	-	-	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Laboratoire de microbiologie alimentaire	31	-	-	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
Equipement	Etuve "labo aliment" 36 ±1°C	-	-	-	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>

Pour les coliformes fécaux deux échantillons dépassent la norme en vigueur «>10 UFC/cm<sup>2</sup>, les surfaces du laboratoire des aliments et laboratoire des eaux présentent avant désinfection des valeurs qui dépasse la norme, à savoir «31 UFC/cm<sup>2</sup> » et « 11 UFC/ cm<sup>2</sup> », respectivement. Les autres prélèvements sont dépourvus des coliformes fécaux.

On remarque que la plupart des échantillons n'hébergent pas les bactéries indicatrices de contamination fécales dans les équipements et les surfaces de travail.

### 3. Dénombrement des Staphylococcus

L'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*, est *Staphylococcus aureus*, qui est un Cocci Gram positif, catalase positive, réduisant le tellurite de potassium en tellure noire et capable de synthétiser deux enzymes une protéase et tardivement une lipase. Le milieu utilisé pour l'isolement de *Staphylococcus aureus* est le milieu gélosé sélectif Baird Parker.

Elles se multiplient plus facilement en aérobie qu'en anaérobie. Il exige des acides aminés et des vitamines. Il est mésophile et sensible à l'acidité. Il tolère des concentrations élevées de NaCl et des Aw relativement basses (>0.90). Elle est responsable d'intoxications alimentaires et dans certains cas extrêmes de septicémies physiques.

Les résultats obtenus lors de cette étude sont représentés dans les tableaux 7 et 8, toutes les colonies sont des staphylocoques blancs.

**Tableau 7 : Dénombrement des Staphylococcus sur milieu Baird Parker**

Lieu de prélèvement	Nature d'échantillon	Stade de prélèvement				Seuil
		Avant désinfection	Avant manipulation		Après manipulation	
	Après désinfection eau de javel 1/10		Après désinfection bactéricide			
Surface d'environnement de travail	Laboratoire des eaux	Incomptable	70	-	13	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Laboratoire de microbiologie alimentaire	248	100	22	18	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
Equipement	Etuve "labo aliment" 36 ±1°C	80	10	-	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>

Les *Staphylococcus* isolés sont dans la plupart des échantillons sont des Staphylocoques blancs. Ces germes pathogènes sont incomptables au niveau de laboratoires des eaux. Pour le laboratoire des aliments ses valeurs ont été diminuées jusqu'à 248 UFC/cm<sup>2</sup> pour les échantillons avant désinfection, 100 UFC/cm<sup>2</sup>, 22 UFC/cm<sup>2</sup> et 18 UFC/cm<sup>2</sup> respectivement pour les différents échantillons. La diminution de la charge des Coliformes est remarquable après la désinfection par bactéricide.

**Tableau 8 : Dénombrement des *Staphylococcus* sur milieu Baird Parker « à partir des boîtes de contact »**

Lieu de prélèvement	Nature d'échantillon	Stade de prélèvement		Seuil
		Avant désinfection En UFC/cm <sup>2</sup>	Après désinfection eau de javel 1/10 En UFC/cm <sup>2</sup>	
Surface d'environnement de travail	Laboratoire des eaux	80	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Laboratoire de microbiologie alimentaire	30	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Surface de préparation des milieux de culture	45	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Surface de laverie	260	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>
Equipement	Etuve « labo eau » 36 ±1°C	20	-	<10 UFC/cm <sup>2</sup>
	Chariot de ramassage des échantillons analysés	70	-	>10 UFC/cm <sup>2</sup>

La recherche des *Staphylococcus* est négative pour tous les prélèvements réalisés après désinfection par eau de javel 1/10. Les résultats des autres sites de prélèvement montrent que les échantillons sont trop chargées 80UFC/cm<sup>2</sup>, 70UFC/cm<sup>2</sup> par les *Staphylocoques* à titre d'exemple.

De point de vue hygiénique, la quasi-totalité des échantillons ont révélé la présence de *Staphylococcus* avec une charge microbienne relativement élevée.

#### 4. Dénombrement des *Pseudomonas*

Bacilles à Gram négatif, oxydase +, Aérobie stricts. Dégradant le glucose par respiration aérobie ou inerte vis-à-vis du glucose. Ils n'attaquent pas les sucres ou les attaquent par voie oxydative et non fermentative, généralement mobiles, colonies souvent pigmentées.

Ces bactéries, largement répandues dans l'environnement, vivent dans le sol et l'eau. Elles se retrouvent dans les matières organiques non vivantes. Elles se rencontrent chez l'homme ou l'animal, au niveau des fosses nasales. Elles constituent, pour la plupart, une flore commensale. Certaines jouent un rôle pathogène, chez l'Homme et l'animal (avec principalement *Pseudomonas aerogenosa*).

Nos résultats indiquent que tous les échantillons ont été dépourvus de *Pseudomonas*.

## II. Discussion

La présente étude a porté sur la caractérisation bactériologique des échantillons prélevés auprès de quatre salles du laboratoire MHA et sept surfaces différentes. L'analyse bactériologique de ceux-ci a révélé la présence de germes d'altération à savoir la flore mésophile aérobie totale, les coliformes « totaux et fécaux » et un type de germes pathogènes les *Staphylococcus*. On souligne également l'absence des *Pseudomonas* dans la totalité des échantillons.

Dans un premier temps, on va aborder l'interprétation des résultats de la recherche des microorganismes indicateurs d'altération. Concernant les prélèvements par écouvillonnage des surfaces du laboratoire des eaux et celui du laboratoire de microbiologie alimentaire présentent une charge de la flore mésophile aérobie totale élevée qui dépasse le seuil maximal fixé à 10 UFC/cm<sup>2</sup>, tandis que les prélèvements par boîte de contact, les cinq échantillons prélevés « Laboratoire des eaux, Surface de préparation des milieux de culture, Surface de laverie, Etuve 36 ±1°C « labo eau », Chariot de ramassage des échantillons analysés », présentent une charge tolérable de la flore totale. Tout au contraire à la surface du laboratoire de microbiologie alimentaire qui dépasse le seuil maximal de 10UFC/cm<sup>2</sup>. La présence des Coliformes Totaux et Fécaux représentent une autre forme d'indication d'altération, la totalité des échantillons prélevés présentent des valeurs tolérables par rapport à la norme autorisée qui fixe une valeur maximale de tolérance de 10UFC/cm<sup>2</sup>.

Dans un deuxième temps, on souligne la présence des Staphylocoques blancs dans les 22 échantillons prélevés, à l'exception d'un seul échantillon « Etuve 36 ±1°C du laboratoire de l'eau » sur 22 qui renferme un taux relativement faible des Staphylocoques.

La présence des germes avant et après désinfection peut être due à l'effectif des stagiaires au sein du laboratoire, donc des activités d'analyses énormes par rapport aux normales, alors plus d'utilisation des étuves programmées pour l'incubation des boîtes, ce qui explique la présence des germes revivifiables et pathogène, et le dysfonctionnement de la procédure de désinfection durant le travail. La concentration élevée des staphylocoques peut être également expliquée par les essais réalisés par les stagiaires qui ont travaillé avec des souches de Staphylocoque ce qui a engendré une dissémination des staphylocoques dans les paillasse.

Une étude réalisée par « 14 » a montré que généralement que les bactéries à gram négatif comme les coliformes, *Pseudomonas* sont plus facilement inactivés par le N-D que les bactéries à gram positif à titre d'exemple « Staphylocoques »

La résistance des germes peut être aussi un facteur considérable de la contamination des paillasse par la formation de biofilm qui se fait en plusieurs étapes, pendant lesquelles les bactéries adhèrent à la surface des équipements, se protègent grâce à une couche de polysaccharides, et se développent sous forme de colonies. La destruction de la couche de protection est très difficile avec les moyens classiques de désinfection. La plupart des biocides nécessitent un temps d'action ou/et une concentration élevée pour agir à l'intérieur du biofilm et ainsi attaquer les cellules.

Une autre étude réalisée par « 15 » a montré que la résistance aux désinfectants différait de façon importante selon la relation temps-concentration désinfectant, la nature de la surface, la structure et l'âge du biofilm.

Le N-D provoque la formation d'aérosols, ces fines particules portent des micro-organismes susceptibles de recontaminer les surfaces désinfectées en se redéposant. Le pouvoir contaminant de l'air est multiplié par 10 à 100 environ lorsqu'il y'a formation d'aérosols surtout pendant le nettoyage à la pression, la charge bactérienne en termes d'UFC retrouvée sur les surfaces proviendrait de la contamination aéroportée « 16 ».

Dans notre étude, la bactéricide est très efficace par rapport à l'eau de javel dilué 1/10.

On déduit que, le choix de désinfectants et le temps de N-D jouent un rôle important dans un laboratoire d'analyse microbiologique, pour éviter les contaminations croisées et fausser les résultats.

## *Conclusion et Recommandations*

L'environnement d'un laboratoire est exposé à des risques infectieux dû à la manipulation des agents d'altération, infectieux « liquides biologiques, les souches... ».

Le nettoyage et la désinfection sont des opérations qui permettent de garantir la qualité microbiologique des surfaces de travail.

C'est dans ce contexte que le présent travail a permis de contrôler la qualité microbiologique des surfaces de travail au sein du laboratoire MHA et de quantifier et qualifier la flore microbienne, en se basant sur deux méthodes écouvillonnage et boîte de contact.

Nos résultats révèlent que la totalité des échantillons prélevés n'ont pas répondu aux valeurs limites en matière des microorganismes, à savoir que la totalité des échantillons renferment des Staphylocoques. En ce qui concerne les indicateurs d'altération, on note une charge très élevée de la FMAT figurante dans tous les échantillons. En contre partie, on a noté une satisfaction vis-à-vis la charge des coliformes totaux et fécaux et *Pseudomonas*

Le manque ou le dysfonctionnement de nettoyage et désinfection peut générer des risques biologiques pour le personnels d'un laboratoire de microbiologie, afin d'éliminer ce risque ou au moins le diminuer il faut tenir en compte un paramètre très important, *Quand doit-on nettoyer ou désinfecter.*

En vue d'éviter cette non-conformité des mesures préventives doivent être appliqués, dont on titre : La nécessité de reboucher les flacons ou les pots après usage afin d'éviter toute dispersion des souches dans les paillasse. Il est recommandé également de respecter la procédure de nettoyage après et avant chaque manipulation afin de réduire le risque de contamination.

Afin de minimiser les risques de contaminations, ces tests de contrôle périodique sont nécessaires dans un laboratoire d'essai microbiologique.

Les phases de N-D avant et après chaque manipulation, les bonnes pratiques et l'évaluation des risques, s'avèrent nécessaire pour des résultats valides.

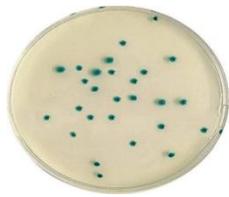
## *Références bibliographiques*

- « 1 » : <http://mon.univmontp2.fr/claroline/backends/download.php?url=L0FuYWx5c2VzX7Vi aW9sb2dpcXVlcy5wZGY%3D&cidReset=true&cidReq=COMICRO>
- « 2 » : [www.inrs.fr/dms/inrs/CataloguePapier/ED/TI-ED-6188/ed6188.pdf](http://www.inrs.fr/dms/inrs/CataloguePapier/ED/TI-ED-6188/ed6188.pdf)
- « 3 » : Gérin M. Gosselin P. Cordier S et al.2003 : Environnement et santé publique. Fondements et pratiques. Editions Tec et Doc, Edisem.
- « 4 » : JD. CAVALLO, G. ANTONIOTTI,et al.2002 : Surveillance microbiologique de l'environnement dans les établissements de santé AIR, eaux et surfaces.
- « 5 » : Cordier S.2005 : Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET).4p
- « 6 » : Réseau Interrégional des Professionnels en Hygiène Hospitalière (RIPHH) Novembre 2007 -Marseille
- « 7 » :Zuliani V., 2005. Prédiction de la contamination bactérienne lors de la fabrication et de la conservation d'un aliment. Application a de la viande de porc contaminée par *Listeria monocytogenes*.
- « 8 » : [https://www.iaea.org/sites/default/files/43205783742\\_fr.pdf](https://www.iaea.org/sites/default/files/43205783742_fr.pdf)
- « 9 » : [www.inrs.fr/dms/inrs/CataloguePapier/ED/TI-ED-6188/ed6188.pdf](http://www.inrs.fr/dms/inrs/CataloguePapier/ED/TI-ED-6188/ed6188.pdf)
- « 10 » : ISO DIS 14698-1
- « 11 » : ElissaKhamisse, 2012. Etude du microbiote susceptible de persister sur les surfaces d'un atelier de la filière viande bovine. Sociologie. Agro Paris Tech, Français.
- « 12 » : <http://eduterre.enslyon.fr/thematiques/hydro/travailcoop/protocoles/analysesBact/coliforme>
- « 13 » : [www.beep.ird.fr/collect/eismv/index/assoc/MEM02-5.dir/MEM02-5.pdf](http://www.beep.ird.fr/collect/eismv/index/assoc/MEM02-5.dir/MEM02-5.pdf)
- « 14 » : <https://tel.archives-ouvertes.fr/pastel-00003703/document>
- « 15 » : <https://tel.archives-ouvertes.fr/pastel-00770326/document>
- « 16 » : <https://tel.archives-ouvertes.fr/pastel-00770326/document>

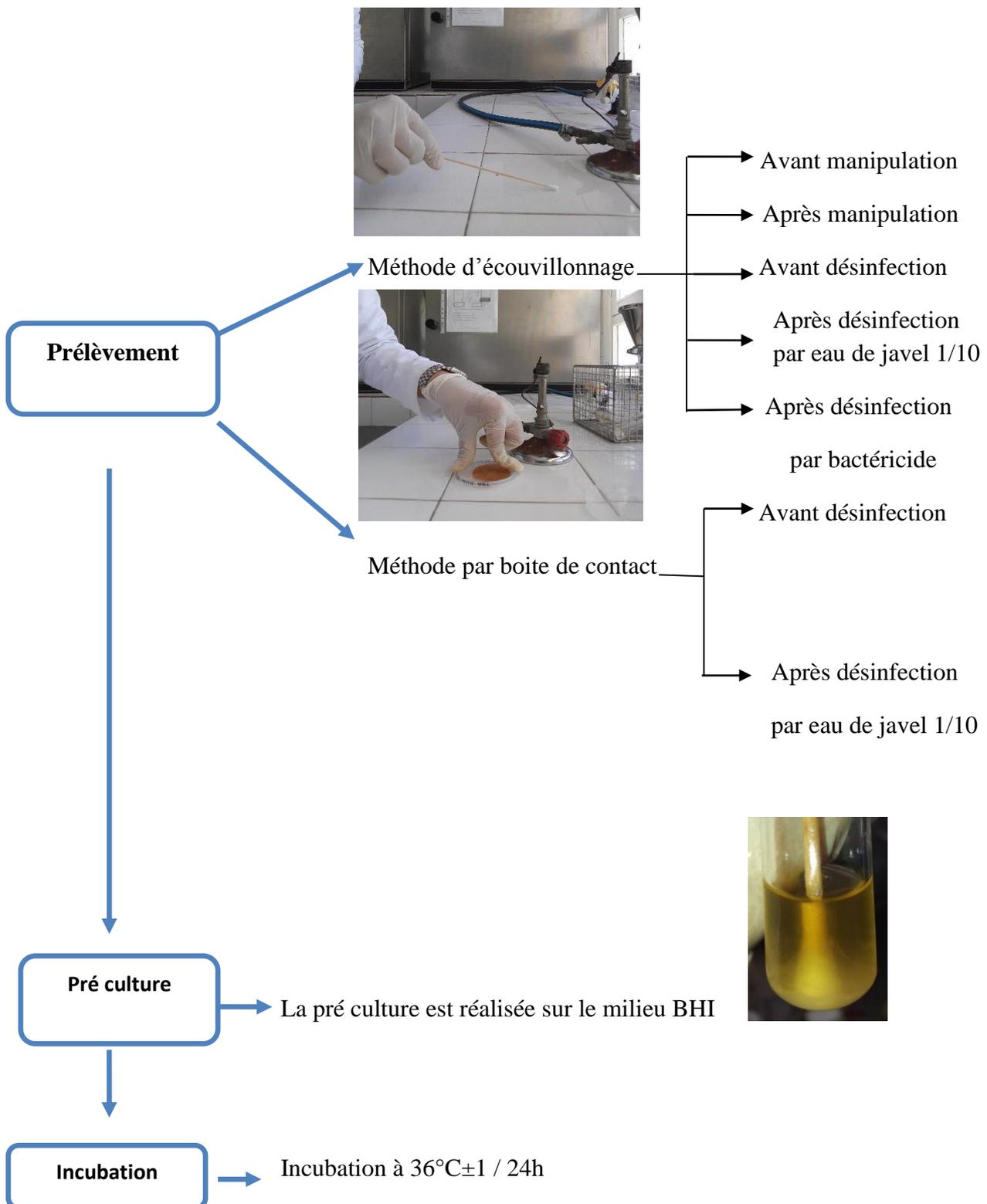
# *Annexes*

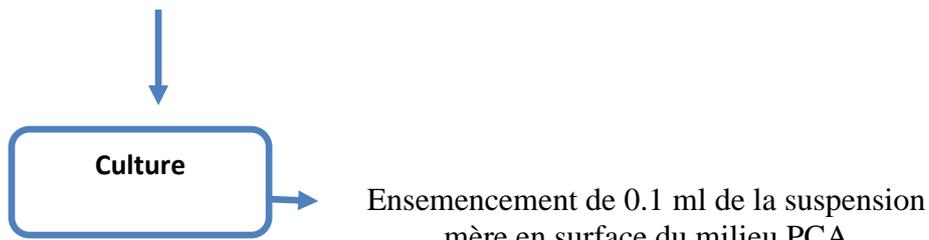
---

# Milieux de culture

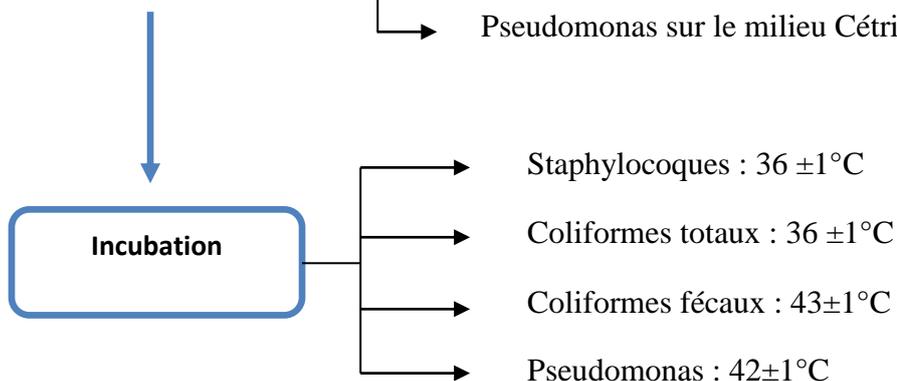
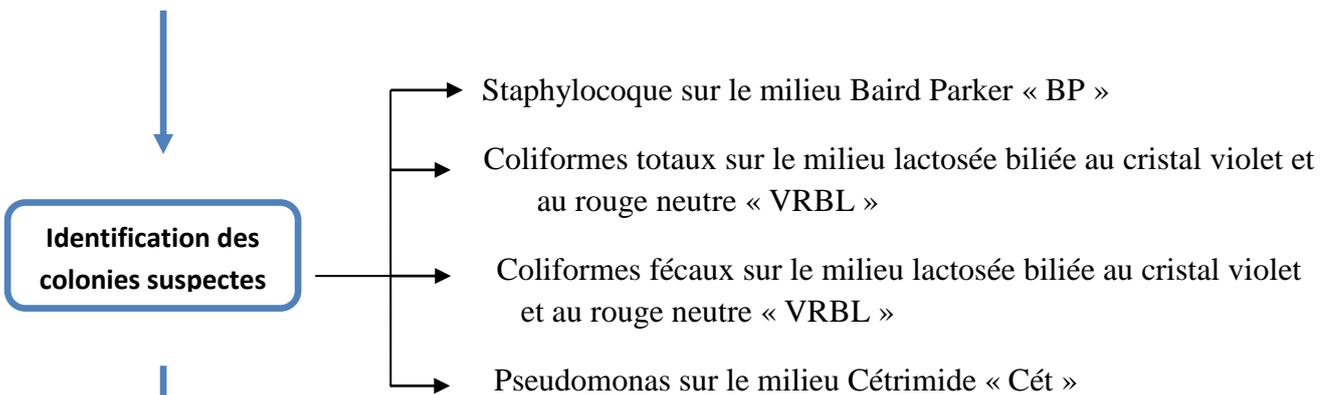
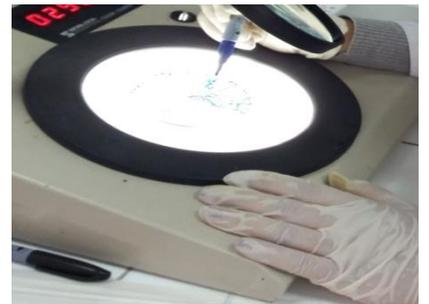
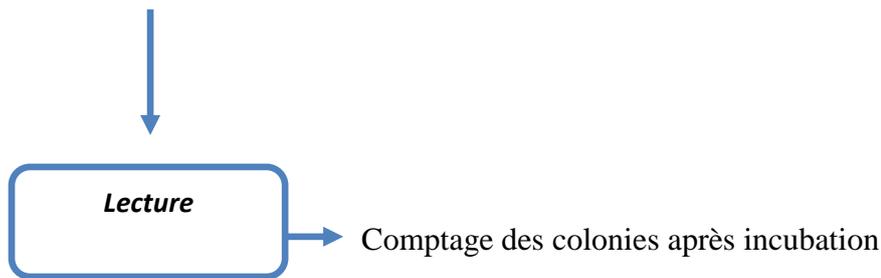
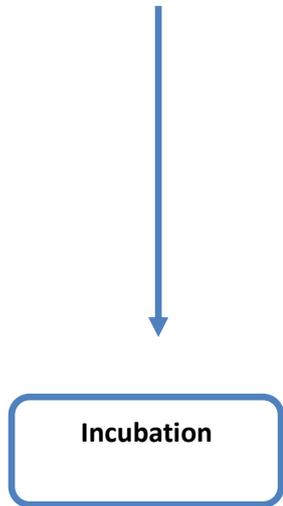
Milieux de cultures	Composition	Germes recherchés	
<b>Baird Parker</b>	Pancreatic digest of casein 10g Yeast extract 1g Meat extract 5g Sodium pyruvate 10g L-Glycine 12g Lithium chloride 5g Agar 20g	<i>Staphylococcus aureus</i>	
<b>BHI</b>	Brain infusion solids 12.5 Beef heart infusion solids 5 Proteose peptone 10 Glucose 2 Sodium chloride 5 Di-sodium phosphate 2.5	La flore totale	
<b>PCA</b>	Yeast extract 2.5 Pancreatic digest of casein 5 Glucose 1 Agar 15	La flore totale	
<b>Cétrimide</b>	Gelatin peptone 20 Magnesiumchloride 1.4 Potassium sulphate 10 Cétrimide 0.3 Agar 13 ;6	<i>Pseudomonas</i>	
<b>VRBL</b>	Peptone pepsique de viande Extrait autolytique de levure Lactose Sels biliaires Chlorure de sodium Rouge neutre Cristal violet Agar Agar bactériologique	Les coliformes	

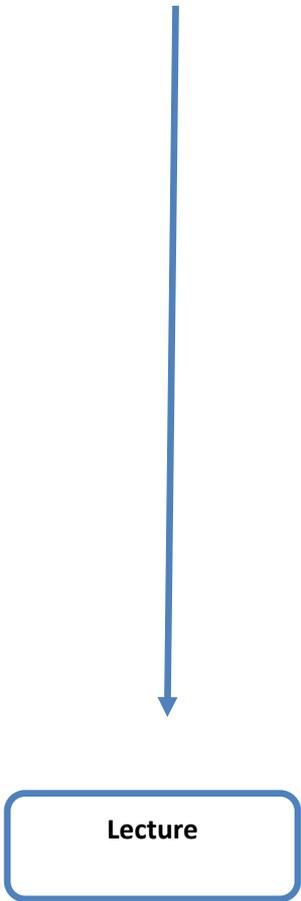
# Mode Opératoire pour la recherche des bactéries par écouvillonnage et boîtes de contact



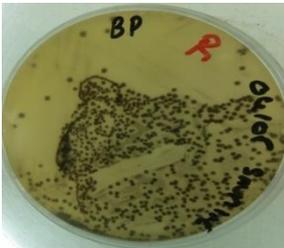


Ensemencement de 1 ml de la suspension mère par incorporation sur gélose PCA





Les colonies caractéristiques sont de couleur rouge brique de 0.5 à 2 mm de diamètre.



Les colonies caractéristiques sont noires ou grises brillantes avec une zone claire de 1mm à 1.5 mm de diamètre.



Les colonies caractéristiques sont vert fluorescent ou bleu  
 La pyocyanine, pigment bleu - vert spécifique de *P. aeruginosa*.  
 La pyoverdine, vert fluorescent, soluble dans l'eau, est synthétisée par les *Pseudomonas* du groupe fluorescent.