**Chapitre 6 : Les techniques rapides de détection**

**6. Les techniques rapides de détection**

L’évaluation de l'activité microbienne est aussi importante que l’évaluation du nombre de microorganismes. Un certain nombre de techniques de détection, relativement récentes, ont été développées, qui visent à donner des réponses plus rapides et ils sont donc souvent dénommées « techniques rapides de détection » :

**6.1 Spectroscopiques**

**a. Réduction des colorants**

Le principe repose sur la réponse d’un colorant redox à la présence de microorganismes métaboliquement actifs qui se traduit par un changement de couleur. Deux colorants sont couramment utilisés pour estimer le nombre de microorganismes viables : le bleu de méthylène (passe du bleu au blanc) et la résazurine, qui a été utilisée dans des contrôles des laits et les viandes fraiches et hachées. Ce colorant est réduit et passe du bleu au rose à l'incolore. Le temps nécessaire à la décoloration peut être mesuré pour évaluer le nombre de microorganismes viables. L’appréciation de la décoloration s’effectue généralement à l’œil ou à l’aide d’un spectrophotomètre.

**b. Mesure d’activités enzymatiques**

La technique des colorants redox repose sur l’évaluation de l’activité de la réductase, cependant de nombreux autres enzymes ont été utilisés pour détecter et évaluer la présence des microorganismes, c’était le cas des : phosphatases, estérases (pour évaluer le nombre des bactéries viables dans le lait, viandes et le poissons), et la glutamate décarboxylase (pour évaluer le nombre d’E. coli dans le lait).

**c. Dosage de coenzymes (réaction de bioluminescence du système ATP-luciférine-luciférase)**

Cette technique (ATP-métrie) utilise le système ATP-luciférine-luciférase. Certains microorganismes peuvent émettre de la lumière en conséquence de l'activité de la luciférase sur la luciférine. La réaction nécessite la présence de Mg++ et de l'ATP qui facilite la formation du complexe ATP-luciférine-luciférase, le complexe est oxydé par l'oxygène en donnant l'oxyluciférine dans un état excité. L'état excité de la molécule retourne à l'état stable (fondamental d'énergie inférieure) et libère un photon de lumière (se dissocie et libére à nouveau l'enzyme luciférase). Il est possible de mesurer soit l’intensité de la lumière émise à son maximum, soit la quantité de la lumière émise. Dans les deux cas, les résultats obtenus sont proportionnels à la concentration d'ATP présente et éventuellement proportionnels au nombre de microorganismes présents. Avant le dosage, une extraction de l'ATP microbienne doit être réalisée par lyse des cellules microbiennes. Cette technique est, cependant, utilisée pour surveiller l'hygiène dans les industries.

**d. Marqueurs radiométriques**

Cette technique est basée sur l'incorporation des 14C marqué dans un milieu de croissance de sorte que, lorsque les microorganismes utilisent ce métabolite, le 14CO2 est libéré et ainsi il mesuré par utilisation d'un compteur de radioactivité ou par un spectrophotomètre. Le 14C est incorporé en 14C-glucose pour les microorganismes qu’ils utilisent habituellement, sinon il est incorporé en 14Cformate ou 14C-glutamate pour les autres. La technique consiste à réaliser une culture en milieu contenant la molécule marquée et après l'incubation la culture est testée périodiquement pour déterminer la présence de 14CO2. Le temps nécessaire pour détecter le 14CO2 est inversement proportionnel au nombre de microorganismes présents.

**6.2. Électrochimique**

**a. Impédancemétrie**

Cette technique mesure la baisse de l'impédance dans un milieu pourvu de microorganismes (l'impédance électrique qui est la résultante de la présence et de l’activité des microorganismes) par rapport au même milieu dépourvu de microorganismes (l'impédance électrique du milieu). Au cours du temps les microorganismes présents dans le milieu dégradent de grandes molécules électriquement neutres ou faiblement chargées (protéines, polyosides…) et produisent des molécules plus petites ionisées (acides aminés, acides organiques…) conduisant à la diminution de l'impédance du milieu. La technique consiste à réaliser des cultures dans des cuvettes, au fond desquelles sont fixées des électrodes de mesure du bactomètre (appareil qui assure automatiquement l'incubation et la lecture simultanément). Elle est utilisée pour la détection et l’évaluation des principaux contaminants (germes aérobies, Entérobactéries, coliformes, bactéries lactiques, levures et moisissures).

**7.3. Autres Procédés (Microcalorimétrie)**

Cette technique repose sur la mesure des faibles variations de chaleur (mesure de l'enthalpie impliquée dans la dégradation de substrats de croissance). La production de chaleur mesurée, au moyen de microcalorimètres, est étroitement liée aux activités cataboliques des microorganismes.