

CHAPITRE 3 : Collecte, transport et préparation des échantillons

1. Techniques de collecte d'échantillons

Les prélèvements concernent souvent des éléments indivisibles, tels que les boîtes de conserve, les bouteilles, ou des produits de petite taille. Par exemple, on pourrait prélever une boîte de conserve de légumes pour vérifier la qualité microbiologique ou une bouteille de lait pour analyser la présence de bactéries pathogènes. Dans ces cas, l'élément est généralement analysé l'élément en entier pour garantir des résultats précis. Parfois, le prélèvement doit être réalisé sur des produits en vrac, comme une cargaison de céréales où des échantillons sont prélevés de plusieurs endroits du sac ou du silo pour évaluer la charge microbienne dans l'ensemble. Cette méthode est également pertinente pour des produits comme la farine, où la répartition inégale de micro-organismes peut être un facteur à prendre en compte.

1.1. Conditions générales de collecte des échantillons

Lors de la collecte, plusieurs conditions doivent être respectées pour garantir la qualité et la représentativité de l'échantillon.

- **La quantité à prélever** : La quantité d'échantillon varie en fonction du type d'analyse et de la nature du produit. Par exemple, lors de l'analyse de la viande hachée, on pourrait prélever 5 échantillons de 50 grammes chacun pour effectuer une analyse microbiologique. Cette quantité permet d'assurer une analyse représentative et facilite les répétitions nécessaires pour confirmer les résultats et détecter des variations possibles de contamination entre les échantillons.
- **L'homogénéité** : La répartition des micro-organismes dans l'échantillon n'est pas toujours uniforme, surtout dans le cas de produits volumineux ou hétérogènes. Pour une analyse microbiologique de lait en poudre contenu dans un grand sac, par exemple, il est nécessaire de bien mélanger le contenu avant de prendre plusieurs échantillons de différentes sections. Cela garantit une distribution aussi uniforme que possible des micro-organismes, pour que l'échantillon prélevé représente fidèlement le produit entier.
- **Les précautions d'asepsie** : Pour éviter toute contamination externe qui pourrait fausser les résultats, il est crucial d'utiliser des techniques d'asepsie strictes. Par exemple, lors de la collecte d'un échantillon de yaourt destiné à un test en laboratoire, le récipient doit être préalablement stérilisé à l'autoclave, et le prélèvement réalisé avec des instruments également stérilisés. L'utilisation d'un bec Bunsen pour maintenir un environnement aseptique réduit le risque de contamination, et il est essentiel d'éviter tout mouvement ou discussion autour de la zone de prélèvement pour garantir la stérilité de l'échantillon.

1.2. Prélèvements pour le contrôle microbiologique des surfaces

Les prélèvements de surface permettent d'étudier la flore présente sur la surface d'un aliment, le matériel de fabrication ou de stockage, les récipients, les emballages, les plans de travail,

les murs et les sols des locaux, et éventuellement les mains du personnel. Plusieurs techniques sont disponibles pour ce type de contrôle.

a) Écouvillonnage

Cette méthode est particulièrement avantageuse car elle permet des prélèvements dans des endroits peu accessibles, comme les coins de machines de production, ainsi que sur des surfaces planes, comme les tables de travail. On utilise un écouvillon en coton hydrophile, stérilisé dans un tube à essai. Avant le prélèvement, l'extrémité de l'écouvillon est trempée dans une solution stérile de tryptone-sel additionnée de 0,05% de Tween 80 (polysorbate). Le prélèvement se fait par frottement sur la surface à analyser, par exemple sur une étagère de stockage alimentaire, puis l'extrémité est trempée et agitée dans un tube contenant 10 ml du milieu précédemment utilisé ou de l'eau physiologique à 1% d'hexamétophosphate de sodium (calgon). Toutes les manipulations doivent être réalisées dans des conditions d'asepsie pour éviter la contamination externe. L'analyse est ensuite effectuée à partir de la suspension obtenue.



b) Rinçage

Cette méthode est idéale pour le contrôle de récipients et de tuyauteries. Par exemple, pour vérifier la propreté des tuyaux de transfert de produits laitiers, le rinçage se fait avec un volume connu d'eau physiologique stérile additionnée de 0,05% de Tween 80. Plusieurs rinçages peuvent être effectués selon l'importance de la contamination, avec une agitation au besoin. Si les tuyauteries ont été traitées avec de l'eau chlorée, il est essentiel d'ajouter des cristaux de thiosulfate de sodium pour neutraliser les résidus d'antiseptiques.



c) Impression directe sur milieu gélosé

Cette méthode utilise des boîtes de Pétri spéciales dont le couvercle est plus haut que la partie contenant la gélose. Ces boîtes sont stérilisées, puis remplies de gélose nutritive ordinaire jusqu'à déborder légèrement pour présenter une surface convexe. Par exemple, pour contrôler la propreté des plans de travail, la boîte est ouverte, et la gélose est appliquée directement sur

la surface pendant 10 secondes en exerçant une pression modérée. Elle est ensuite incubée à la température appropriée pour observer la croissance microbienne éventuelle.



d) Impression indirecte par emploi de ruban adhésif

Le ruban adhésif, stérilisé par rayonnement UV dans une boîte de Pétri ouverte, est utilisé pour capturer les micro-organismes d'une surface. Par exemple, pour contrôler la propreté des mains du personnel, le ruban est extrait avec une pince stérile, appliqué sur la paume de la main pour une adhérence optimale, puis transféré sur un milieu gélosé. Après incubation, les colonies qui apparaissent indiquent le niveau de contamination.

1.3. Prélèvements pour le contrôle de l'air

Ces prélèvements, d'une grande importance dans les environnements industriels, s'effectuent de plusieurs manières :

- **Exposition dans les salles** : Des boîtes de Pétri contenant du milieu gélosé sont ouvertes et exposées pendant 30 minutes à une heure à l'air ambiant. Par exemple, dans une salle de production de produits alimentaires, des boîtes peuvent être placées sur les tables de travail pour évaluer la qualité de l'air en capturant les micro-organismes présents. Après l'exposition, les boîtes sont incubées jusqu'à l'apparition des colonies.
- **Utilisation d'une fiole à vide** : Cette méthode implique une fiole à vide contenant un milieu de culture liquide, fermée par un bouchon avec un tube de communication qui plonge dans le milieu. En aspirant un certain volume d'air à l'aide d'une trompe à vide, l'air barbote dans le milieu de culture. Par exemple, dans une usine de transformation, cette méthode permet d'évaluer la contamination de l'air dans les zones de conditionnement.



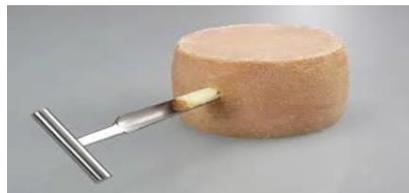
1.4. Prélèvements des aliments solides

Selon la nature du produit, les prélèvements peuvent être réalisés à l'aide de différents instruments, notamment :

- **Scalpel** : Utilisé pour inciser des aliments comme la viande ou le poisson, en prélevant des échantillons de chair interne. Par exemple, un morceau de viande peut être prélevé avec un scalpel pour analyser la contamination microbienne.



- **Sonde** : Utilisée dans le cas de fromages pour prélever des échantillons à l'intérieur du produit. Par exemple, une sonde peut être insérée dans un fromage à pâte molle pour obtenir un échantillon sans contaminer la surface extérieure.



- **Pipette harpon ou myectome** : Ces instruments permettent de prélever des échantillons liquides ou semi-liquides, comme les sauces. Avant utilisation, ces instruments doivent être soigneusement stérilisés. Généralement, la surface exposée à l'air est éliminée par grattage ou stérilisée par flambage ou cautérisation à l'aide d'une plaque métallique rouge. Si l'on souhaite étudier la flore de surface, cette précaution n'est pas nécessaire, et la méthode d'écouvillonnage peut être employée pour le prélèvement.



1.5. Prélèvements des produits alimentaires liquides

La technique de prélèvement varie selon la nature du produit, son volume et la forme du récipient :

- **Homogénéisation** : Elle peut être réalisée manuellement avec une tige de verre ou un agitateur métallique stérile, ou mécaniquement dans des systèmes spécialement équipés. Par exemple, pour un jus de fruits, une tige de verre peut être utilisée pour bien mélanger le produit avant prélèvement.
- **Échantillonnage** : Selon le volume du produit, on utilise des pipettes, des louches ou des flacons lestés. Par exemple, pour prélever un échantillon de soupe dans une grande casserole, une louche stérile est souvent utilisée.



- **Billes de verre** : Il est pratique de prévoir des billes de verre à l'intérieur des flacons destinés aux prélèvements, car elles facilitent l'homogénéisation du prélèvement au laboratoire, par exemple, en s'assurant que les particules solides sont bien réparties dans une sauce.



1.6. Prélèvements des aliments non homogènes

Pour les aliments non homogènes, il est essentiel de prélever proportionnellement un peu de chaque élément. L'analyse est ensuite réalisée après homogénéisation (broyage). Par exemple, pour un plat cuisiné comme une paella ou certaines conserves de salades variées, il faut s'assurer que chaque composant (riz, fruits de mer, légumes) soit représenté dans l'échantillon avant analyse.



2. Traitement de l'échantillon avant analyse

L'échantillon fourni au laboratoire peut être un produit liquide, solide ou hétérogène, prélevé dans un récipient stérile, ou un produit emballé tel qu'il est commercialisé.

2.1. Conditions de conservation et de transport des échantillons

- **Étiquetage**
L'étiquette doit inclure tous les éléments nécessaires à la bonne exploitation des résultats, tels que la date, l'heure, le lieu, la température et le nom de la personne ayant effectué le prélèvement. Par exemple, une étiquette sur un échantillon de lait prélevé

devrait indiquer « Lait entier, prélevé le 31/10/2024 à 10h00, lieu : ferme XYZ, température : 4°C, préleveur : Dr. A. Dupont ».

- **Stabilité**

La composition microbiologique de l'échantillon ne doit pas évoluer entre le moment de prélèvement et celui de l'analyse. Les principaux facteurs à considérer qui peuvent affecter cette stabilité sont :

- **Le temps** : Le délai admissible entre le prélèvement et l'analyse dépend du type d'aliment et des conditions de transfert (surtout la température). En général, il est de 24 heures. Par exemple, pour des échantillons de produits laitiers, il est crucial de réaliser l'analyse dans les 24 heures suivant le prélèvement pour garantir la précision des résultats. Si le laboratoire est sur place, comme dans un site de production, l'analyse peut être effectuée immédiatement.
- **La température** : Les variations de température peuvent modifier la microflore. Un échauffement peut entraîner une prolifération anormale, tandis qu'une forte réfrigération (surtout la congélation) peut détruire les micro-organismes fragiles. Par exemple, si un échantillon de poisson est prélevé lors d'une journée chaude, il est recommandé de le placer immédiatement dans une glacière avec de la glace pour éviter une élévation de température. Si la température extérieure est élevée et le transfert au laboratoire est long, des enceintes isolantes (glacières) avec un système de réfrigération doivent être utilisées. Il est important de ne pas congeler un échantillon qui ne l'est pas. Cependant, si le produit est congelé, il faut éviter sa décongélation en utilisant un mélange de glace et de sel ou de la neige carbonique pour le maintenir à basse température.



- **Milieux de transport**

Dans certains cas, il est nécessaire d'utiliser un milieu limitant la mortalité de micro-organismes particulièrement fragiles pendant le transport. Ces milieux sont faiblement nutritifs et favorables au métabolisme des micro-organismes sans permettre une

multiplication excessive. Par exemple, le milieu de transport utilisé pour **Vibrio** est l'eau peptonée alcaline, qui aide à maintenir la viabilité des bactéries pendant le transport tout en évitant leur prolifération excessive.

2.2. Homogénéisation et broyage

L'ouverture des récipients ou des emballages doit être effectuée dans des conditions aseptiques. Pour les produits liquides ou semi-liquides, une homogénéisation est réalisée par agitation. Pour les produits visqueux, un agitateur mécanique peut être utilisé. Concernant les produits solides, il faut procéder à un broyage couplé à une dilution. Voici différentes techniques de broyage :

a) Broyage au sable ou aux billes de verre

On utilise un mortier contenant de 5 à 20 g de sable de Fontainebleau ou de billes de verre (diamètre = 0,5 mm). Un pilon est placé dans le mortier, et l'ensemble est emballé dans un papier aluminium et stérilisé. Le broyage se fait près du bec Bunsen tout en ajoutant progressivement le volume du diluant (eau physiologique, par exemple). On laisse ensuite reposer quelques minutes (selon le protocole d'analyse) et on prélève le surnageant.



Exemple : Cette méthode est simple et utile pour la recherche de produits très fragiles comme la toxine botulinique présente dans certains aliments mal conservés. En utilisant cette technique, on peut extraire et identifier la présence de toxines dans des échantillons de conserves alimentaires.

b) Broyage mécanique

Le système utilisé doit être stérile ou stérilisable et permettre la dispersion des micro-organismes sans les détruire. La température ne doit pas trop s'élever au cours du broyage, ce qui nécessite d'employer des récipients de broyage réfrigérés (par immersion dans la glace).

Exemple : On distingue différents types d'appareils, comme les broyeurs de type mixeur et le broyeur Stomacher. Par exemple, le broyeur Stomacher est souvent utilisé dans les laboratoires pour homogénéiser des échantillons de viandes ou de produits laitiers.



Le milieu de broyage est constitué d'eau physiologique, de Ringer $\frac{1}{4}$, d'eau peptonée ou de milieu tryptone-sel. Ces deux derniers milieux permettent de maintenir les micro-organismes dans un bon état physiologique, mais leur utilisation exige de réaliser les dénombrements dans l'heure suivant la dilution pour éviter la multiplication des micro-organismes.

Exemple : Lors de l'analyse d'échantillons de produits laitiers, on peut utiliser un milieu de Ringer pour préserver l'intégrité des bactéries lactiques tout en effectuant le broyage. Cela permet de réaliser des analyses microbiologiques précises, essentielles pour garantir la qualité et la sécurité des produits laitiers.

2.3. Standardisation de la suspension

- Lorsque le produit est liquide, les résultats sont rapportés au ml du produit brut (nombre de micro-organismes/ml de produit).
- Si le produit a subi des opérations de broyage et d'homogénéisation, les résultats d'analyse sont d'abord ramenés au ml de suspension, puis au gramme d'aliment (X ml de suspension correspond à Y grammes d'aliment).

Exemple : Pour un échantillon de jus de fruit, si l'on trouve 10^6 micro-organismes/ml, cela signifie qu'il y a 10^6 micro-organismes dans chaque millilitre de jus. Si ce jus a été homogénéisé et qu'on a utilisé 10 ml de suspension provenant de 50 g de fruits, on peut alors dire que chaque gramme de fruits contenait 2×10^6 micro-organismes.

2.4. Techniques de dilution

Les dilutions sont nécessaires dans le cas des produits contenant un nombre élevé de micro-organismes. Elles sont réalisées à l'aide d'eau physiologique stérile, de Ringer au $\frac{1}{4}$ ou de milieu Tryptone-sel.

La technique de base consiste à préparer des séries logarithmiques dont les termes sont en progression géométrique, par exemple, les dilutions décimales : 0,1 (10^{-1}), 0,01 (10^{-2}), 0,001 (10^{-3}), 0,0001 (10^{-4}), etc.



On utilise ainsi des tubes stériles contenant 9 ml de diluant. On prélève, après homogénéisation, 1 ml de la suspension mère à l'aide d'une pipette stérile, et on le porte dans le tube de dilution 10^{-1} . À l'aide d'une nouvelle pipette, on homogénéise le contenu du tube 10^{-1} et on prélève 1 ml de ce tube et on le porte dans le tube de dilution 10^{-2} , et ainsi de suite en changeant à chaque fois de pipette pour ne pas perturber les dilutions.

2.5. Choix du diluant

Le diluant doit être « neutre » vis-à-vis des micro-organismes : il ne doit pas être trop riche pour permettre leur croissance, et ne doit pas les inhiber ou les tuer. Certains micro-organismes sont très sensibles à l'eau distillée (comme les staphylocoques), d'autres aux solutions salines comme l'eau physiologique ou le milieu de Ringer (comme *E. coli*). Cependant, cette action dénaturante n'intervient qu'après plusieurs heures. Ces problèmes peuvent être évités en utilisant un milieu adéquat (tryptone-sel) et surtout en limitant le temps de contact avec le diluant.

Actuellement, il paraît souhaitable, sauf indication complémentaire à un type donné de produit à analyser, de réaliser les préparations et les dilutions des échantillons à analyser dans une solution de tryptone-sel. Tous ces diluants sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes.

2.6. La revivification

Les micro-organismes sont souvent « endommagés » mais non tués au cours des traitements technologiques (déshydratation, chaleur, froid, etc.) appliqués aux produits alimentaires. Cela signifie qu'une fois réhydratées dans un milieu approprié, ces bactéries peuvent retrouver leur capacité de croissance.

Exemple : Avant d'analyser des échantillons de viande ayant subi un choc thermique, il est important de les placer dans un milieu nutritif adapté pour permettre aux bactéries de récupérer, afin d'éviter des résultats erronés lors de l'analyse, exp : dans le cas de la contamination par *Salmonella*, si des cellules sont endommagées par des traitements thermiques, elles pourraient ne pas se multiplier dans un milieu de culture sélectif. Cela pourrait conduire à une conclusion erronée sur la sécurité du produit alimentaire.

