

**Prélèvement et préparation des
échantillons pour l'analyse
microbiologique des aliments**

1- Prélèvement des échantillons ou échantillonnage

1- 1- Généralités

Le prélèvement des échantillons (échantillonnage) en vue d'un contrôle microbiologique nécessite des précautions particulières afin que l'échantillon prélevé reflète fidèlement la flore microbienne du produit dont il dérive.

Échantillon : Quantité de produit prélevé d'un lot et soumis à des essais en laboratoire.

Lot : Partie d'une même fabrication présentant les mêmes caractéristiques.

Lorsque le prélèvement se porte sur des **éléments indivisibles** (boîtes de conserves, pots de yaourts, bouteilles d'eau, ou de soda, portion de fromages) aucune précaution particulière n'est prise surtout lorsque ces éléments sont emballés individuellement. Le prélèvement est réalisé en le prenant en l'état.



Lorsque le prélèvement porte sur des **produits liquide ou solide en vrac** (sacs de semoule ou farine, sac de cacao ou d'arachide) ou sur des produits de grande taille (carcasse de viande, cuves de liquide de grand volume, meule de fromage de grande taille) des précautions particulières s'imposent afin d'assurer la représentativité de l'échantillon prélevé et d'éviter les contaminations externes au moment de l'opération de prélèvement.

Cuve de liquide

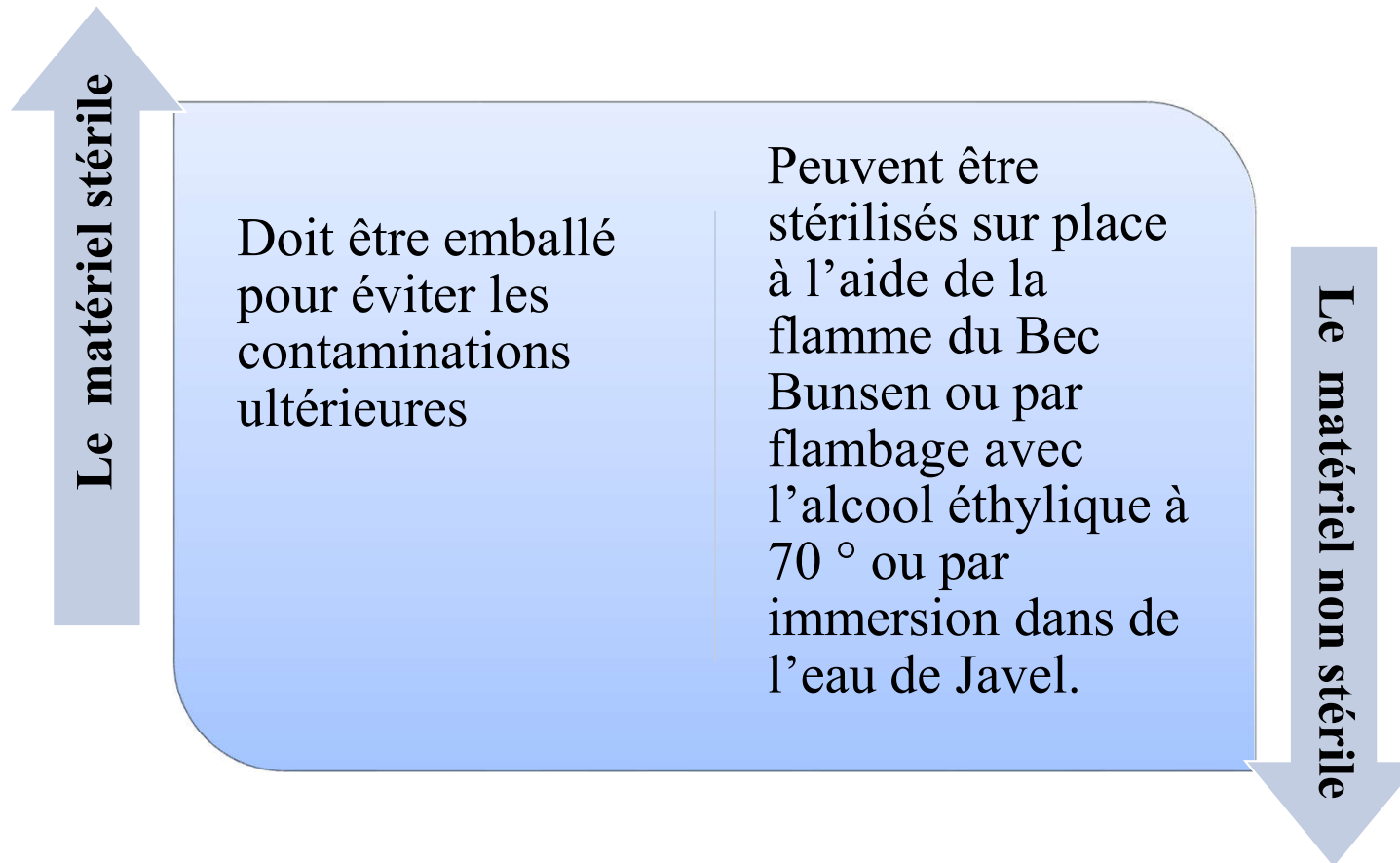
1- 2- Conditions générales de prélèvement

Homogénéité

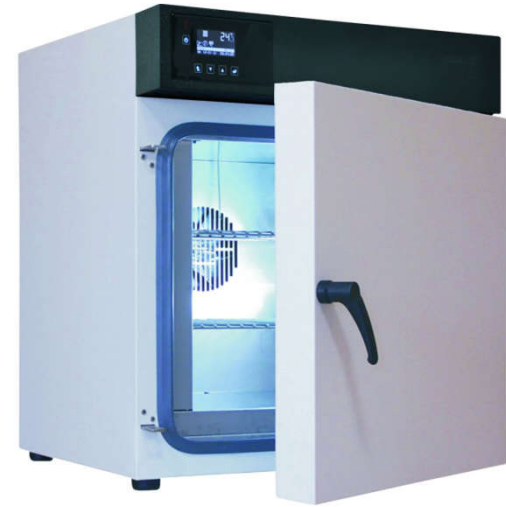
- ➡ Les microorganismes ne sont pas répartis d'une manière homogène dans le produit surtout lorsque celui-ci est solide ou de structure hétérogène ou un liquide de grand volume.
- ➡ Lorsque le produit est de structure hétérogène (fromage, carcasse de viande) et solide, un prélèvement composite (de chaque partie) est effectué. Le mélange des prélèvements composites conduit ainsi à une évaluation globale du niveau de la contamination.
- ➡ Dans le cas des produits alimentaires liquides ou sous forme de poudre, il est possible de faire des prélèvements composites à un niveau ou après homogénéisation en vue d'un prélèvement d'un échantillon unique.

Précaution d'aseptie

- ✗ Pendant l'opération du prélèvement la microflore du produit à analyser ne doit subir aucune modification ni qualitative ni quantitative.
- ✗ Les prélèvements doivent être effectués en aseptie avec et dans du matériel préalablement stérilisé au laboratoire.



- ➡ Le trempage dans l'alcool et le flambage sont parfois insuffisants car la température atteinte n'est pas assez élevée.
- ➡ Il est nécessaire d'utiliser des flacons propres, secs, à col large stérilisés au four Pasteur (160°C - 10 min) ou par autoclavage (121°C - 30 min) ou encore à usage unique et stériles ; leur taille doit être adaptée au volume de l'échantillon.
- ➡ Les récipients peuvent être en verre, en métal ou en matière plastique (polyéthylène, polycarbonate, polypropylène); dans ce dernier cas il s'agit de récipients à usage unique dont la stérilisation est obtenue à froid (radiations gamma ou beta).
- ➡ Dans tous les cas les récipients de prélèvement doivent posséder un système de fermeture hermétique.



Four Pasteur



Autoclave

- ✗ Le prélèvement de l'échantillon est réalisé aussi en aseptie en utilisant une lampe à gaz portative en prenant les précautions nécessaires, pour éviter la perturbation dans la zone d'aseptie (éviter les courant d'air, les déplacements, la discussion...).

Prélèvement des produits liquides

La technique des prélèvements varie selon la nature, le volume et la forme du récipient contenant le produit liquide.

Dans tous les cas il faut faire :

- ✓ Une homogénéisation manuellement à l'aide de tige de verre ou d'un agitateur mécanique stérile.
- ✓ Un prélèvement par une pipette ou par un flacon.
- ✓ Lorsque le liquide est prélevé à partir d'un réseau public (exemple, l'eau potable), il est indispensable de purifier le circuit pour éliminer les zones de stagnation.

Prélèvement des produits solides

- ✿ Le prélèvement est selon la nature du produit. Le scalpel ou la sonde (de fromager par exemple) sont les instruments les plus utilisés pour les prélèvements des produits solides.



Scalpel



Sonde à fromage

- ✿ Le plus souvent la surface exposée à l'air est éliminée par grattage ou par cautérisation ou flambage... La surface exposée à l'air peut être étudiée par la méthode d'**écouvillonnage**.



- ✿ Dans le cas des produits hétérogènes comme les carcasses de la viande ou plats cuisinés, l'échantillon est constitué de prélèvements composites.

1- 3- Méthodes de prélèvement

Les méthodes de prélèvement des échantillons varient selon la nature du produit à analyser.

a- Prélèvements pour le contrôle des surfaces

Le contrôle des surfaces permet d'estimer la qualité microbiologique de la surface des aliments et aussi les surfaces intervenants dans le processus de fabrication du produit alimentaire.

Le prélèvement à partir des surfaces peut être effectué par :

Ecouvillonnage

- Un écouvillon stérile dont l'extrémité est préalablement trempée au moment du prélèvement dans une solution stérile de tryptone- sel additionnée de 0,05% de tween 80.



Ecouvillon

- Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface à analyser, puis plongé dans le tube contenant la solution précédente ou de l'eau physiologique en vue de collecter les germes grattés de la surface à analyser.
- Les analyses sont effectuées à partir de la suspension ainsi réalisée.

Rinçage

- Méthode applicable pour les surfaces inaccessibles comme les récipients ou la tuyauterie.
- Le rinçage est fait plusieurs fois avec la solution stérile + 0,05 % tween 80.
- Après agitation, le liquide du rinçage (volume connu) est collecté stérilement.

Impression sur gélose

Le prélèvement peut être effectué directement par impression sur milieu gélosé ou indirectement par impression à l'aide d'un ruban adhésif.

Impression sur gélose

Impression directe sur milieu gélosé

Les boîtes de Petri stériles coulées à ras bord de milieu de culture sont appliquées sur la surface à étudier

Impression indirect sur ruban adhésif

Le ruban adhésif stérilisé au UV (10- 20 min) est appliqué sur la surface à étudier de façon à ce qu'il adhère parfaitement . Après quelques secondes de contact, il est retiré et appliqué sur la surface d'un milieu gélosé approprié. Après quelques heures de contact à la température d'incubation désirée, il est retiré et la boîte est incubée jusqu'à apparition des colonies.

Méthode du cylindre

Un cylindre creux est appliqué sur la surface à analyser; on y introduit alors quelques ml de diluant stérile et après quelques secondes de contact, le diluant est retiré et analysé.

b- Prélèvements pour le contrôle de l'air

Le contrôle microbiologique de l'air est important en milieu industriel. Les prélèvements s'effectuent par :

- ➡ Exposition de boîtes de Petri coulées avec un milieu de culture solide. Les boîtes sont exposées à différents endroits surtout ceux exposées aux courants d'air.
- ➡ Utilisation de fiole à vide contenant un milieu de culture liquide isolée du milieu extérieur par un bouchon.
- ➡ En aspirant, un certain volume d'air à travers un tube plongé dans le milieu de culture. Celui-ci est ensuite incubé.



Fiole à vide

2- Préparation des échantillons

- Les échantillons fournis au laboratoire consistent en des prélèvements de produits liquide, solide ou hétérogène prélevés dans un récipient stérile ou emballés.
- Les analyses microbiologiques sont faites toujours à partir d'une suspension liquide parfaitement standardisée par rapport au produit de départ.
- Une préparation s'avère indispensable pour ramener les produits sous forme liquide..
- La préparation inclue l'ouverture de l'emballage, la prise de la quantité aliquote pour analyse de l'échantillon et l'homogénéisation ou fluidisation du produit couplée ou non au broyage et enfin la préparation des dilutions à partir de la suspension mère.

2- 1- L'ouverture des récipients et emballages

Cas des boîtes métalliques

- ❏ Après homogénéisation du contenu, la partie supérieure de la boîte est nettoyée à l'aide d'un coton imbibé d'alcool puis flambée à l'alcool en évitant un chauffage trop fort au risque de modifier la microflore.
- ❏ La boîte est ouverte en aseptie et avec des outils stériles (poinçon métallique, ouvre boîte..). Si une boîte est bombée, il est impératif de prendre des précautions pendant l'ouverture pour éviter les projections du produit.
- ❏ La boîte est mise sous un entonnoir stérile et une fois que le poinçon a percé le couvercle, il ne doit être retiré qu'après que le gaz responsable du bombage est échappé. Après l'entonnoir et poinçon sont retirés pour continuer l'ouverture comme s'il s'agissait d'une boîte normale.
- ❏ Le prélèvement est retiré selon le cas à l'aide d'une pipette, spatule ou sonde.

Cas des bouteilles

- Les bouteilles sont renversée et sa capsule et col étroit sont plongés dans l'alcool puis flambés.
- Si la bouteille est en plastique, le flambage n'est pas obligatoire ou fait rapidement.
- Après désinfection, la bouteille est ouverte on enlevant la capsule à l'aide d'un décapsuleur ou en perçant la capsule.

Autre emballage

Les autres emballages sont ouverts stérilement et la méthode varie selon le type d'emballage..