

## 9. Traitement de l'échantillon avant l'analyse

### 9.1. Conditions de conservation et de transfert des échantillons au laboratoire

#### 9.1.1. Étiquetage

Quand le prélèvement aseptique a été réalisé il faut identifier immédiatement le produit avec une étiquette ou une référence. Il est souhaitable de ne pas utiliser de crayons feutres sur des films plastiques (PVC) car l'encre peut pénétrer et perturber l'analyse. L'étiquette doit comporter tous les éléments nécessaires à la bonne exploitation des résultats de l'analyse :

- Numéro d'ordre (Le numéro de facture).
- Date, heure du prélèvement, lieu précis et l'heure de réception du produit.
- Modalités particulière du prélèvement (méthode d'échantillonnage, technique de prélèvement, incident éventuel ...).
- Indications utiles telles température de la salle, température et pH d'un aliment voisin, etc.
- Noter la température initiale et la température de transport.
- Nom de la personne ayant effectué le prélèvement.
- Une description du produit prélevé :
  1. Nom du produit échantillonné ;
  2. Fournisseur ;
  3. Identification de la matière première ;
  4. Propriétés physiques et sensorielles contrôlées à la réception de la marchandise ;
  5. Le nom du propriétaire ou du détenteur du produit prélevé.
- Information sur le transport :
  - Le nom du transporteur
  - L'identification du véhicule de transport
  - L'identification de la remorque de transport
  - La signature du technicien ayant prélevé le produit
  - Rapport d'échantillonnage

Amener alors les échantillons le plus rapidement possibles au laboratoire en maintenant les conditions initiales dans lesquelles se trouvait le produit. L'analyse devrait être réalisée dans l'heure qui suit le prélèvement.

Dès réception au laboratoire l'échantillon accompagné de sa fiche signalétique est enregistré (nature, date, heure, provenance du prélèvement, nom du préleveur, analyses demandées, autres indications utiles).

Si l'échantillon doit être transporté il faut réduire au maximum le délai avant l'analyse. Il est souvent nécessaire de réfrigérer (mais non congeler) le produit au cours de son transport ; certains germes fragiles peuvent disparaître au cours de cette réfrigération. Si un produit est déshydraté ou en conserve il ne doit pas être réfrigéré.

#### 9.1.2. Stabilité

La composition microbiologique de l'échantillon ne doit pas évoluer entre le moment du prélèvement et celui de l'analyse.

Les principaux facteurs affectant la stabilité sont le temps, la température et évidemment la protection par rapport aux contaminations.

✓ **Le temps** séparant le prélèvement et l'analyse, doit être le plus court possible en maintenant les conditions initiales dans lesquelles se trouvait le produit. Lorsque le laboratoire se trouve sur les lieux du prélèvement l'analyse doit être effectuée dans l'heure qui suit le prélèvement. Lorsque l'échantillon doit être transporté ou expédié il faut utiliser le moyen de transport le plus rapide et prendre des précautions particulières.

Le délai admissible entre prélèvement et analyse est variable en fonction du type d'aliment et des conditions de son transfert (température) : il est généralement de 24 heures.

✓ Les variations de **température** peuvent modifier la flore : un échauffement peut déclencher une prolifération anormale alors qu'une forte réfrigération (ou congélation) peut détruire des germes fragiles. Idéalement, la température de l'échantillon ne doit pas varier entre le prélèvement et l'analyse, mais cela est difficile lorsque la température extérieure est élevée et le transfert au laboratoire long. Il est souvent nécessaire de réfrigérer (mais non congeler) le produit au cours de son transport ; certains germes fragiles peuvent disparaître au cours de cette réfrigération. Si un produit est déshydraté ou en conserve il ne doit pas être réfrigéré.

Pour un **produit congelé** s'assurer qu'il n'y ait pas de décongélation pendant le transport (ce produit peut être gardé pendant 1 mois avant d'être analysé). La congélation d'un produit provoque une diminution plus ou moins importante du nombre de germes qu'il contient. Il faut veiller à ce que la température du produit prélevé soit au moins égale à  $-18^{\circ}\text{C}$ , transporter le produit à cette température et décongeler à l'air ambiant à température voisine de  $20^{\circ}\text{C}$  pendant un temps inférieur à 3 heures, temps suffisant pour atteindre une texture qui permette le prélèvement.

Les variations de température sont limitées par l'emploi d'enceintes Isolantes (bacs en polystyrène ou à double parois du type « glacière »).

### 9.1.3. Milieux de transport

Dans certains cas il est possible ou nécessaire d'utiliser pendant le transport un milieu limitant la mortalité de germes particulièrement fragiles : il s'agit de milieux faiblement nutritifs qui sont favorables au métabolisme des germes mais sans permettre une multiplication qui affecterait leur nombre au moins pendant un délai raisonnable.

**Exemple :** milieux de transport pour *Vibrio*.

## 9.2. Les risques au laboratoire de microbiologie

Il est clair que les risques liés à la manipulation de microorganismes, dont l'identité et le pouvoir pathogène sont souvent inconnus dans les premières étapes de leur analyse doivent être parfaitement maîtrisés par des pratiques et un environnement sans défaut.

Il faut que le microbiologiste soit toujours conscient des risques liés à la manipulation de bactéries et à un degré moindre de levures et moisissures, en particulier après leur amplification nécessaire à leur étude. Rappelons qu'une colonie est constituée d'environ  $10^9$  à  $10^{10}$  cellules et qu'une turbidité appréciable d'un milieu de culture liquide correspond à environ  $10^8$  cellules par ml.

La maîtrise du risque microbiologique passe par la parfaite connaissance :

- des germes manipulés ou recherchés
- des voies de "pénétration" de ces germes dans l'organisme
- des meilleures méthodes de manipulation pour minimiser ce risque.

Les microorganismes sont classés en 4 groupes en fonction des risques potentiels qu'ils représentent :

- ✓ Le **groupe 1** comprend des microorganismes peu dangereux pour le microbiologiste et son environnement ;
- ✓ Le **groupe 2** correspond à des germes faisant courir des risques modérés aux manipulateurs et des risques limités à la communauté ;
- ✓ Le **groupe 3** est constitué de microorganismes à haut risque pour le manipulateur et à risque modéré pour la communauté ;
- ✓ Le **groupe 4** correspond à de microorganismes très dangereux pour le manipulateur et son environnement.

Les voies de l'infection sont essentiellement :

- **Buccale** (ingestion) : pipetage, porté à la bouche des doigts ou d'objets contaminés comme des cigarettes, des stylos, des aliments etc. Ce type de contamination résulte d'un travail "aseptique" incorrect ou encore de projections, renversements ou actions divers non contrôlés.
- **Aérienne** (trachée artère, poumons) par des aérosols. Ces aérosols peuvent être générés par des opérations classiques et leur pouvoir de contamination est très grand.
- Par **contact cutané** (*Brucella*, *Staphylococcus* ou encore *Pseudomonas* par exemple) ou au niveau de muqueuses ou d'organes comme les yeux.
- Par **pénétration sous-cutanée** accidentelle (par piqûre ou au niveau d'une plaie).

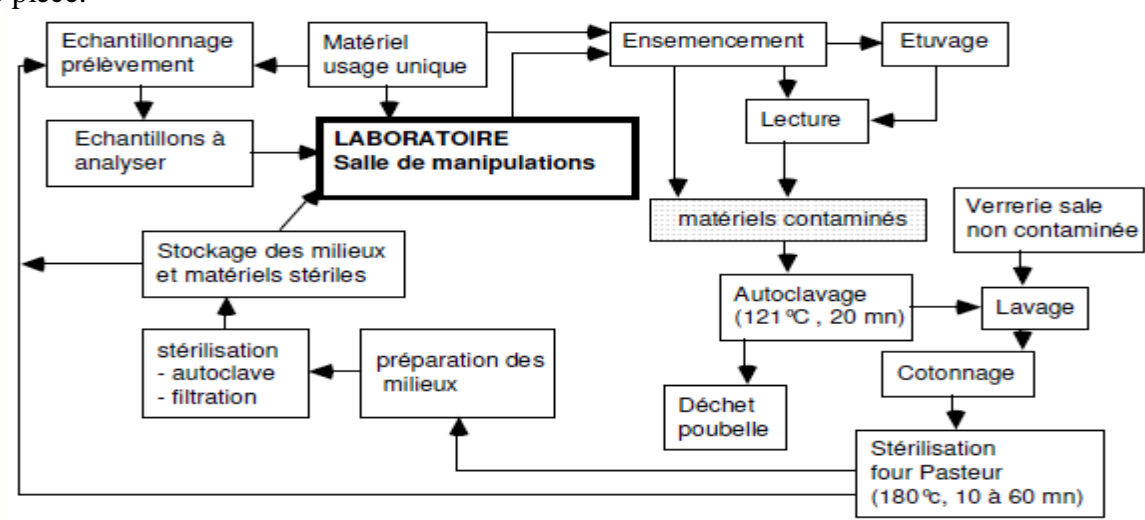
### 9.2.1. Le laboratoire

Le laboratoire d'analyse microbiologique doit être à même de réaliser des analyses de routine, mais aussi de permettre l'évaluation de la qualité des opérations de transformation ou de préparation, la recherche et la maîtrise des éventuels points critiques (HACCP), l'évaluation de l'efficacité des traitements antimicrobiens de conservation, d'emballage ou de nettoyage etc. Les microorganismes susceptibles d'être rencontrés appartiennent pour la plupart aux groupes 1, 2 et éventuellement 3.

Ceci impose donc des règles fondamentales de conception et de fonctionnement du laboratoire d'analyse microbiologique.

Le laboratoire doit être composé de trois parties principales (Figure 1) :

- Le laboratoire proprement dit où sont réalisées les analyses ;
- La salle de préparation des milieux de culture ;
- La laverie qui traite les produits et matériels utilisés pour l'analyse et qui fournit la verrerie et le matériel propre et stérile. La laverie et la salle de préparation peuvent ne constituer qu'une seule pièce.



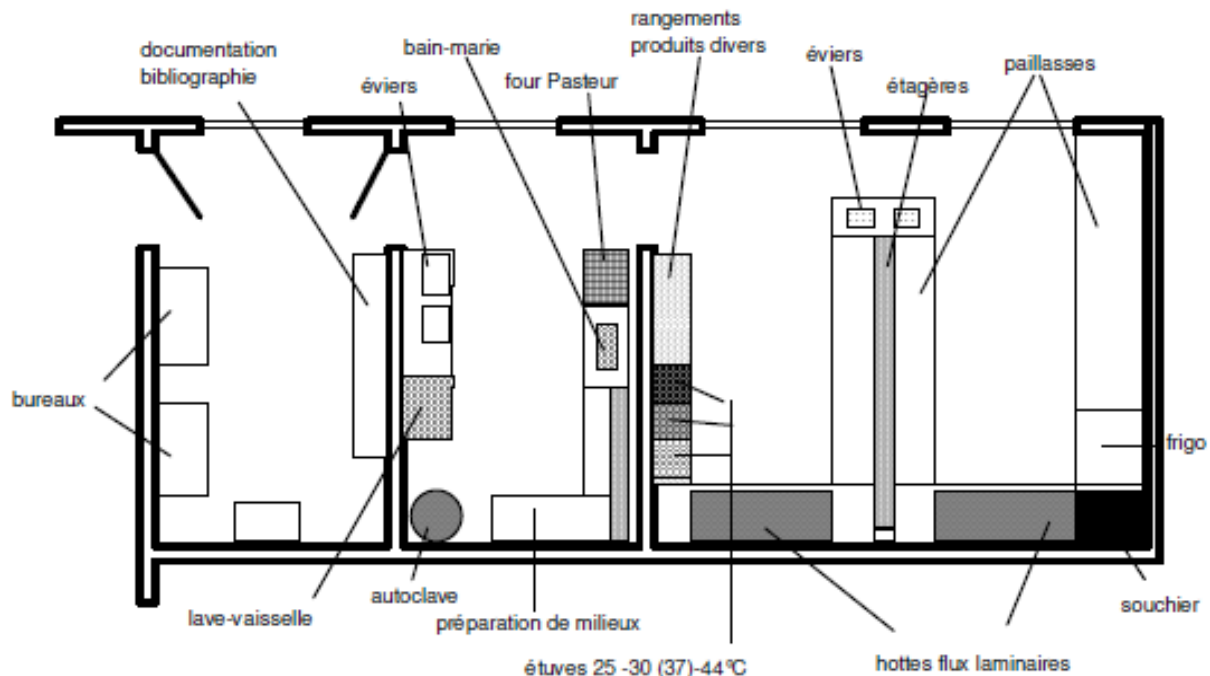
**Figure 1.** Les principales parties d'un laboratoire de microbiologie.

Le laboratoire d'analyse doit disposer :

- d'un espace suffisant avec une circulation limitée. Deux ou trois parties sont souhaitables mais non nécessaires.
- de murs, plafonds et sol lisses mais non glissants, non absorbants, faciles à nettoyer et à désinfecter.
- d'un éclairage naturel ou artificiel de bonne qualité. Les fenêtres coulissantes avec montants aluminium équipées de volets roulants conviennent bien.

- de plans de travail lisses et résistants.
- de lampes UV disposées au plafond et équipées d'une minuterie au moins dans la salle de travail.

Le plan présenté sur la figure 2 est une proposition type de conception du laboratoire. Il ne faut pas perdre de vue que le bon fonctionnement du laboratoire requiert, en particulier aux niveaux des manipulations, des personnels qualifiés. Propreté et règles d'hygiène strictes doivent y régner.



**Figure 2.** Schéma type d'un laboratoire d'analyse microbiologique

### 9.2.2. Matériel d'équipement du laboratoire d'analyse microbiologique

L'équipement d'un laboratoire de microbiologie alimentaire diffère peu de celui d'un laboratoire de bactériologie médicale. Il faut disposer ainsi d'une réserve de produits chimiques les plus courants et de milieux ou de composants de milieux de culture (*déshydratés si possible*) et de colorants.

En microbiologie alimentaire, la fréquence des études quantitatives et qualitatives et leur variété font qu'il est nécessaire de disposer d'un nombre élevé de milieux de culture et de matériels divers.

Il est indispensable de disposer d'un certain nombre d'équipements et de matériels tels que :

#### 9.2.2.1. Systèmes de stérilisation / désinfection et zones stériles :

1) L'**autoclave** vertical ou horizontal pour la stérilisation en milieu vapeur des milieux, des "déchets" est indispensable. La « stérilisation » est généralement réalisée à 115 ou 120°C pendant 10 à 30 minutes.

2) Le **four Pasteur** permet la stérilisation à sec du matériel en verre ou en métal et doit pouvoir atteindre une température de 170-180°C.

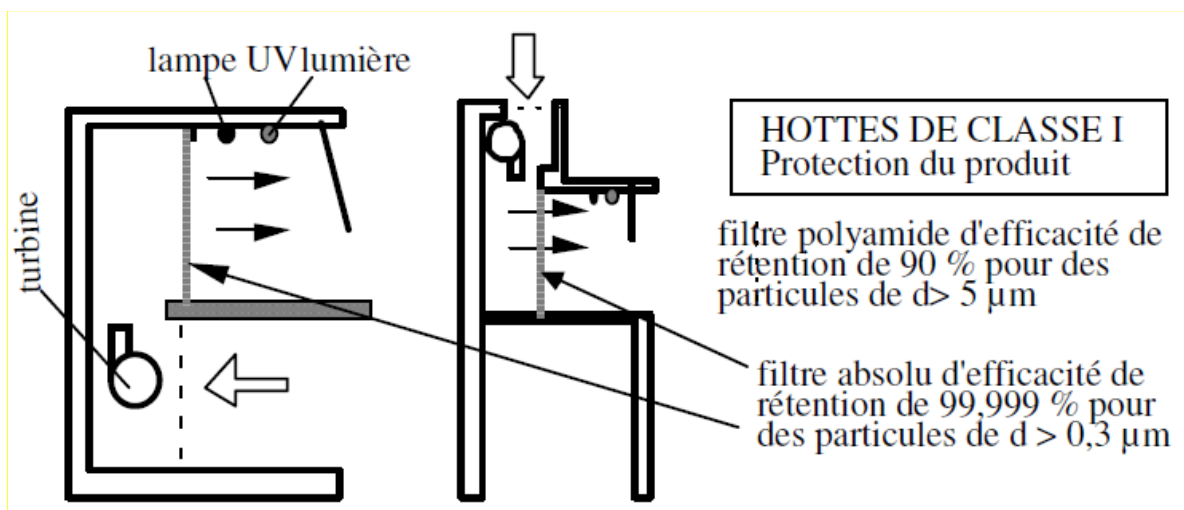
3) Les **système de micro ou ultra filtration à membrane** sont utilisés pour les milieux de culture liquides non autoclavables et pour l'analyse liquides (eau par exemple).

4) Les **lampes UV** germicides munies d'une minuterie et installées dans la pièce principale de manipulation ainsi que dans les hottes à flux laminaire. Leur effet sur un germe donné est

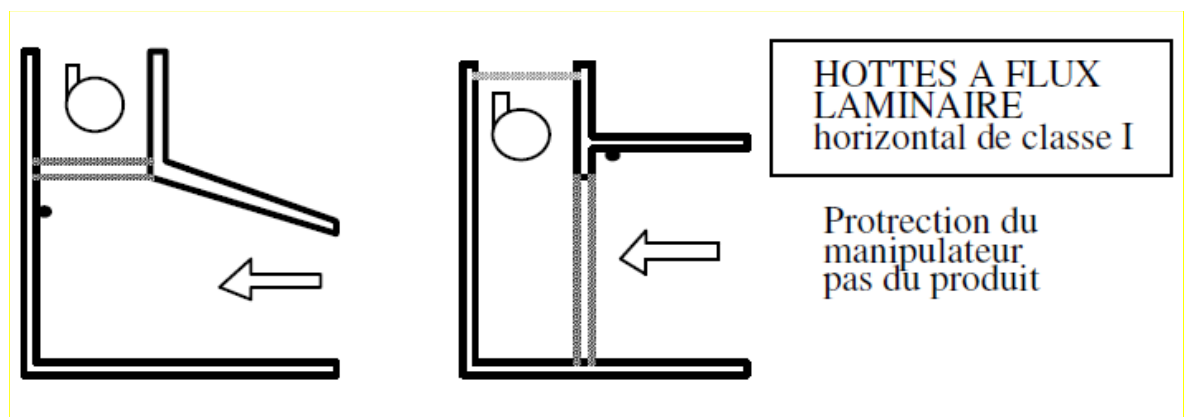
fonction de la puissance de la lampe, de la longueur d'onde du rayonnement UV, de la distance et du temps d'irradiation. Elles sont efficaces sur les « zones éclairées ». Il est essentiel de se protéger vis-à-vis d'une exposition directe, la muqueuse oculaire étant particulièrement sensible.

5) Les **réipients contenant par exemple de l'hypochlorite de sodium** pour recueillir les matériels souillés tels que lames états frais, les pipettes, les cônes à usage unique etc. La récupération des milieux contaminés après lecture peut se faire dans des sacs en polypropylène qui ne seront éliminés qu'après autoclavage.

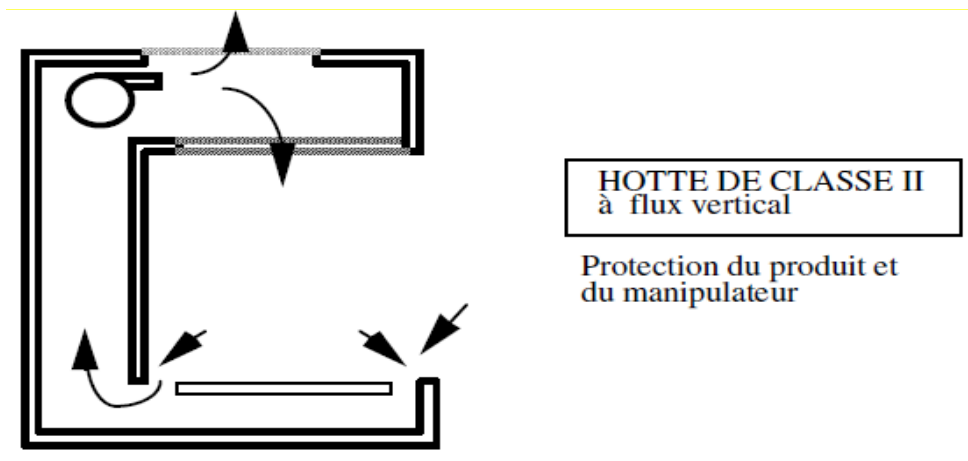
6) Les **zones de travail** sont situées dans la zone de protection de **becs Bunsen** avec déclenchement par bouton "à pied" et/ou dans des **hottes à flux laminaire** qui selon leur fonctionnement "protègent" avec efficacité soit le produit (Figure 3), soit l'opérateur (Figure 4), soit les deux (Figure 5), ces hottes étant classées en trois catégories en fonction de leur fonctionnement. Elles sont utilisées pour la distribution aseptique des milieux et le remplissage de boîtes de Pétri. Un flux d'air stérilisé par filtration est dirigé sur la zone de travail soit horizontalement, soit verticalement avec ou non un recyclage. Il ne s'agit pas de zones de sécurité et les hottes de classe I ne peuvent pas être employées seules pour les manipulations des microorganismes ; dans ce cas, le travail stérile est réalisé dans la zone de protection d'un bec de gaz, ce dernier présentant néanmoins l'inconvénient de perturber le flux d'air dans le système.



**Figure 3.** Hottes à flux laminaire horizontal de classe I avec protection du produit.

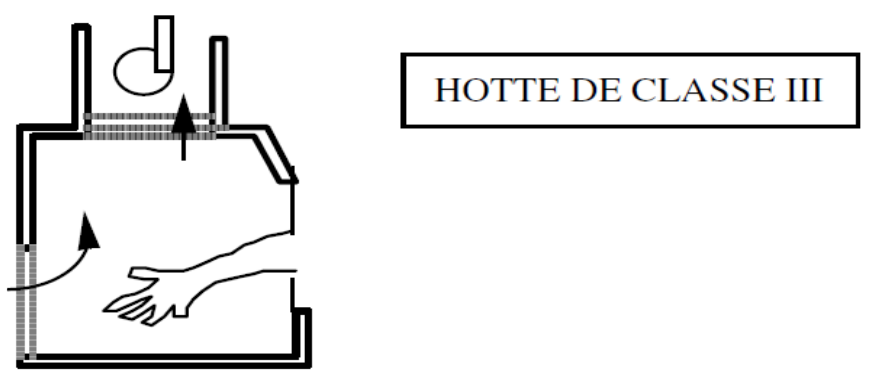


**Figure 4.** Hottes à flux laminaire horizontal de classe I avec protection du manipulateur.



**Figure 5.** Hotte à flux laminaire vertical de classe II avec protection du manipulateur et du produit.

Les hottes de classe III protègent avec une très grande efficacité produit et manipulateur mais restent d'une utilisation difficile. Il s'agit en fait de boîtes à gants étanches et stériles (Figure 6).



**Figure 6.** Hotte à flux laminaire de classe III.

Dans ces hottes la vitesse linéaire de l'air est voisine de  $0,25$  à  $1 \text{ m} \cdot \text{sec}^{-1}$ . La décontamination de ces hottes doit être effectuée quotidiennement. Le formol est certainement le meilleur désinfectant car il assure la stérilisation la plus "homogène ; les phénols laissent des résidus, " et l'hypochlorite est très corrosif. L'étanchéité de la hotte doit être contrôlée ainsi que l'intégralité du filtre stérilisant HEPA. Si ce dernier filtre doit être changé, il faut le faire "aseptiquement" et placer immédiatement le filtre dans un emballage en polypropylène étanche.

#### 9.2.2.2. Matériels d'incubation et de préparation des milieux

Il faut disposer d'étuves bactériologiques qui doivent pouvoir être réglées avec précision entre  $25$  et  $55^\circ\text{C}$ . Trois températures d'étuvage sont généralement utilisées en microbiologie alimentaire.

Deux **jarres anaérobies** et leur nécessaire de contrôle de l'atmosphère sont indispensables à l'étude des germes anaérobies stricts.

Deux **bains-marie** sont nécessaires pour régénérer les milieux de culture ( $100^\circ\text{C}$ ) et les maintenir en surfusion ( $45$  à  $47^\circ\text{C}$ ).

Un **four à microondes** permet de réduire la durée des traitements thermiques des milieux.

Deux **balances** (portée 1 à 2kg au 1/10 de g et portée d'environ 200g au 1/10 de mg) sont indispensables à la préparation des milieux et de l'échantillon.

Il faut toujours disposer de nombreux **tubes** à essai en verre de 16 x 160 ou 18 x 180mm ou des tubes en polycarbonate stériles et à usage unique (tubes à hémolyse) et de **réipients** de volumes variés et stérilisables (flacons, erlenmeyers, béchers etc).

Des pipettes stériles à usage unique, et des systèmes de pipetage « automatiques » à cônes stérilisables en propylène et à usage unique.

Un **agitateur magnétique** chauffant (barreaux téflonés) et une **seringue de Cornwall** ou un **répartiteur** volumétrique sont nécessaires à la préparation et à la distribution des milieux.

### 9.2.2.3. Microscopie

Bien que non prioritaire parmi les équipements, le microscope et son environnement de lames, lamelles, colorants et réactifs divers, constitue un outil important du laboratoire d'analyse microbiologique. Pour un agrément d'utilisation avec un minimum de fatigue et une meilleure image il est souhaitable d'adopter les systèmes binoculaires. Les oculaires x10 sont les plus communs et il faut disposer d'objectifs x10, x 40 à sec et x100 à immersion. L'entretien des parties optiques du microscope doit être réalisé avec soin (xylène et papier joseph); il est aussi nécessaire de vérifier périodiquement le centrage de la lampe avant le condenseur.

Les réactifs colorants les plus utilisés sont ceux qui permettent la coloration de Gram (éthanol, violet de gentiane, lugol, fuchisine) ou des colorations simples (bleu de méthylène phéniqué). Veiller à ne pas « colorer » la peau (doigts en particulier), certains de ces colorants réagissant avec les protéines ou les acides nucléiques.

La présence d'une loupe binoculaire (x 100 par exemple) permet, entre autre, de bien caractériser les colonies.

### 9.2.2.4. Techniques générales

La qualité hygiénique dépend surtout de la nature mais aussi souvent du nombre de la flore microbienne présente dans le produit.

Si cette flore est composée de microorganismes susceptibles d'engendrer des maladies après consommation (maladies infectieuses, toxi-infections, intoxications) le produit est dangereux et ne doit en aucun cas être commercialisé. Il appartient alors au microbiologiste de détecter le ou les points critiques affectant cette qualité hygiénique pour laquelle la norme zéro défaut doit être un objectif prioritaire de l'ensemble du système de production.

En bactériologie alimentaire il n'est donc pas nécessaire de rechercher, de compter et d'identifier systématiquement toutes les bactéries, levures et moisissures présentes dans le produit. Il suffit souvent d'effectuer :

**1) une étude quantitative** de la flore microbienne :

- soit par dénombrement d'une flore microbienne donnée caractérisée par un ensemble de propriétés physiologiques communes comme par exemple numération de la *flore aérobie mésophile* revivifiable sur un milieu du type gélose nutritive ordinaire, la numération des *levures et moisissures* confondues, la numération des *anaérobies sulfito-réducteurs*.

La présence de bactéries d'origine fécale ou tellurique témoigne dans nos aliments d'un manque d'hygiène et d'un défaut de rigueur technique et peut laisser craindre la présence concomitante dans le produit de bactéries entéro-pathogènes en nombre difficilement détectable ou après un temps d'analyse important.

- soit par dénombrement d'un groupe bactérien pouvant correspondre à une contamination déterminée : coliformes thermotolérants et/ou streptocoques du groupe D pour la *mise en évidence d'une contamination d'origine fécale*, staphylocoques pour la mise en évidence d'une contamination d'origine cutanée, germes indologènes, germes putrides, etc...

2) une **recherche orientée** de certaines bactéries pathogènes telles que *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Mycobacterium*, *Listeria*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, etc.... Cette recherche exige l'utilisation de méthodes spécifiques hautement sélectives.

Le plus souvent, ces analyses ne diffèrent d'un produit alimentaire à un autre que par certains détails d'exécution. Parmi les analyses "communes" à tous (ou presque tous) les produits alimentaires on peut citer par exemple les numérations des coliformes ou de la flore "totale".

### 9.3. Préparation de l'échantillon

Les échantillons sont amenés au laboratoire dans leur emballage d'origine s'il s'agit de produits finis ou dans des flacons ou récipients stériles s'il s'agit de produits en vrac ou de "prélèvements". Il faut parfois disposer de matériels permettant le prélèvement d'aliments dans des emballages solides (poinçons, ouvre-boîtes) ou encore de matériels indispensables au prélèvement d'aliments solides (cautérisateurs, pipettes harpons, etc).

Pratiquement toutes les analyses s'effectuent à partir d'une **suspension** liquide parfaitement standardisée par rapport au produit de départ c'est-à-dire de concentration connue. La préparation de l'échantillon nécessitera l'ouverture aseptique des récipients fermés (produits emballés, bouteilles, conserves) et l'homogénéisation ou la fluidisation des produits non liquides. Cette, opération consiste parfois en un broyage couplé à une première dilution.

Le premier traitement auquel sont soumis la plupart des produits consiste, après prélèvement d'une partie aliquote, en une **homogénéisation**. Celle-ci est réalisée au moyen de mortiers ou par des broyeurs à couteaux (Virtis par exemple) ou des appareils de Potter ou encore par un Stomacher (Figure 7).

Cette opération doit permettre la mise en suspension homogène des microorganismes présents sur ou dans le produit analysé en évitant cependant toute contamination externe ou une inactivation des germes par des conditions trop drastiques.

Une **centrifugeuse** atteignant 3 à 4000 g permet, en peu de temps, de décanter les microorganismes présents dans les liquides. Des tubes bouchés sont indispensables pour éviter la contamination aérienne.

Un **vortex** permet d'homogénéiser les suspensions bactériennes présentes dans les tubes, en particulier au moment des dilutions ou des prélèvements. Avec cet appareillage, il faut engendrer un noeud de vibration entre pouce et index à une hauteur du tube qui est en dessous du niveau du coton cardé.

#### 9.3.1. Ouverture des récipients et emballages.

✓ **Boîte de conserve métallique ordinaire** : La surface supérieure de la boîte doit être nettoyée à l'aide d'un coton imbibé d'alcool, puis flambée à l'alcool (Il faut éviter un chauffage trop fort d'une boîte bombée). L'ouverture de la boîte est réalisée dans les conditions d'aseptie classiques à l'aide d'un poinçon métallique de 1 à 2cm de diamètre ou d'un ouvre-boîte stérilisés à la flamme ou flambés à l'alcool. Lorsqu'on a affaire à une boîte bombée des précautions s'imposent car il peut y avoir des projections violentes. La boîte est placée dans un cristalliseur puis sa surface



stérilisée est recouverte d'un entonnoir stérile à tige courte obturée par un coton et dans laquelle on fait passer un fort clou. La pointe du clou est stérilisée à la flamme avant usage.

La perforation s'effectue avec précaution en tapant sur le clou : ce dernier ne doit pas être retiré du trou et doit servir à régulariser la sortie du gaz contenu dans la boîte. Lorsque l'expulsion du gaz est terminée il faut agiter légèrement la boîte sans modifier le système de façon à désobturer éventuellement l'orifice de sortie qui peut avoir été bouché par un fragment solide. Après cette vérification l'entonnoir et le clou sont retirés et la boîte est ouverte stérilement comme si elle était normale.

Le prélèvement s'effectue selon le cas à la pipette Pasteur, à la pipette harpon, à la spatule, à la sonde ...

✓ **Bouteille capsulée** : La bouteille, auparavant agitée, est renversée et sa capsule et son goulot sont plongés dans l'alcool puis flambés. Selon le cas, l'ouverture est réalisée aseptiquement soit en perçant la capsule à l'aide d'un scalpel stérile, soit à l'aide d'une pince ou d'un dé-capsulateur stérile. Le goulot est ensuite flambé avant le prélèvement.

Dans le cas de bouteilles en matière plastique le flambage doit être effectué très rapidement ou supprimé.

✓ **Autre type d'emballage** : Les précautions d'aseptie classiques doivent être respectées dans tous les cas : les récipients de verre pourront être ouverts manuellement, les emballages en plastique ou en carton à l'aide d'un couteau ou de ciseaux stériles. La zone d'ouverture sera nettoyée, désinfectée et éventuellement flambée.

### 9.3.2. Homogénéisation et broyage

Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera "homogénéisé" (liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile ce qui constitue en fait la première dilution.

L'homogénéisation doit permettre la répartition homogène des micro-organismes dans l'échantillon. L'analyse d'une partie aliquote du produit homogénéisé doit être représentative de l'ensemble. Pour **les produits liquides ou semi-liquides** il suffit d'agiter manuellement ; la présence de billes de verre permet d'obtenir une homogénéité satisfaisante.

Pour des **produits visqueux** il est possible d'utiliser un agitateur mécanique. Pour des **produits solides** ou hétérogènes il faut procéder à une opération de broyage couplée à une dilution.

Pour les **produits solides** diverses techniques de "broyage" sont utilisables :

- 1) broyage manuel au Potter ou en présence de sable stérile ou de billes de verre (mortier)
- 2) broyage mécanique

#### ▪ **Broyage manuel au Potter ou en présence de sable stérile ou de billes de verre (mortier)**

On utilise un verre à pied (ou un mortier) contenant 5 à 20 grammes de sable de Fontainebleau ou de billes de verre (0,5mm de diamètre). Un agitateur épais ou un pilon est placé dans le verre ou le mortier et l'ensemble est emballé soigneusement dans du papier Kraft et stérilisé. L'opération de broyage se déroule dans la zone de protection du bec Bunsen pour éviter les contaminations. Après déballage de l'appareil on ajoute 1 volume de produit et 1 volume et demi de diluant et l'on broie l'ensemble. En cours de broyage on rajoute 2 à 5 volumes de diluant. On laisse ensuite reposer 5mm et on prélève le surnageant. Cette méthode n'est pas très pratique mais elle ne demande qu'un matériel simple et elle est indispensable pour la recherche de produits très fragiles comme la toxine botulinique.

### ▪ Broyage mécanique

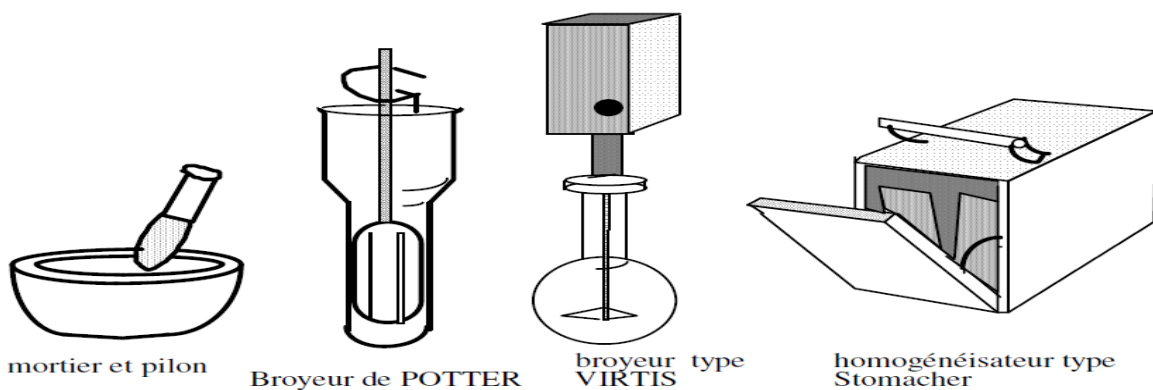
L'appareil utilisé doit permettre un travail aseptique. Il doit être stérilisable. Les appareils donnant le meilleur résultat sont ceux du type mixer, en particulier ceux à couteaux. Les germes doivent être dispersés mais non détruits. De plus, la température ne doit pas trop s'élever au cours de l'opération ce qui nécessite l'emploi de récipients de broyage réfrigérés (par immersion dans la glace). Le broyeur électrique à couteaux de type Virtis est souvent utilisé et donne de bons résultats. Un broyage efficace est réalisé à 45000 tours/min pendant 1mn. Le broyage s'effectue en général avec 10 volumes (ou 9) de diluant pour 1 volume de produit (par exemple 10g de produit et 100ml (ou 90) de diluant stérile).

- Le broyeur du type STOMACHER permet de disperser dans des conditions relativement douces l'aliment dans le diluant. De plus il n'est pas nécessaire, comme dans le cas de l'utilisation d'un broyeur de type Virtis, de stériliser les récipients entre deux utilisations. En effet, le Stomacher (digesteur) utilise des sacs plastiques stériles à usage unique. La prise d'essai est le plus souvent de 1g (ou 25) d'aliment et de 90ml (ou 250) de diluant.

Dans le cas d'analyse de produits très durs (grains, farines, tourteaux granulés pour animaux ...), il est nécessaire d'utiliser un broyeur à billes de verre ou d'acier.

Le diluant de broyage est constitué d'eau physiologique, de Ringer au 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 ou de les réanimer. Leur emploi demande des précautions : les dénombrements doivent être réalisés dans l'heure suivant la dilution pour éviter la multiplication des germes (dilutions maintenues à température ambiante).

Selon le mode de broyage utilisé, le type de l'appareil et ses conditions d'utilisation, le diluant, etc., les résultats de "analyse sont variables.



**Figure 7 : Schéma des divers systèmes de broyage / homogénéisation.**

**(a) broyeur à main (mortier et pilon), (b) broyeur électrique à pédale type stomacher, (c) broyeur électrique type mortier et pilon, (d) broyeur électrique type à couteaux.**

### 9.3.3. Les diluants

Au cours de la préparation des échantillons (et des dilutions) les microorganismes peuvent être inhibés ou même altérés par le changement du milieu lié à l'addition de diluant (changement de pH mais surtout de force ionique). L'effet bactéricide de certains diluants est connu : *Staphylococcus aureus* est "tué" en quelques heures dans de l'eau distillée de même que la plupart des entérobactéries (*E. coli*) ; il en est de même pour *Streptococcus pyogenes* dans du sérum physiologique ou dans du Ringer au 1/4 et pour *Escherichia coli* dans de l'eau salée à 8,5‰.

Actuellement il paraît souhaitable, sauf indication afférente à un type donné d'aliment, de réaliser les préparations et les dilutions des échantillons à analyser dans une solution de tryptone sel. En absence d'information le choix se fera en fonction de la composition du produit à analyser : si le produit est riche en protéine et en minéraux, Ringer ou eau physiologique suffisent et même une solution de phosphate à 2% et pH 7,4 dans le cas des fromages frais, crèmes fraîches et caséinates.

| tryptone sel  | Ringer<br>(solution mère)  | Eau<br>physiologique      | Eau peptonée<br>tamponnée   |
|---|--|---------------------------|---|
| tryptone 1 g<br>NaCl 8,5 g<br>eau D 1000 ml<br>pH = 7 | NaCl 9 g<br>KCl 0,42 g<br>CaCl <sub>2</sub> 0,48 g<br><br>NaHCO <sub>3</sub> 0,2 g<br>eauD 1000 ml | NaCl 9 g<br>eau D 1000 ml | bacto peptone 20 g<br>NaCl 5 g<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 9 g<br><br>K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 g<br>eau D 1000 ml<br>pH = 7,2 |

Tous ces diluants sont stérilisés à 121°C pendant 20minutes.

Il faut noter que les milieux tryptone-sel et eau peptonée tamponnée permettent, dans des conditions particulières (température, temps), de réaliser une revivification.

L'eau peptonée tamponnée est utilisée avec certains produits acides au fort pouvoir tampon comme les yaourts.

**9.3.3.1. Techniques de dilution** Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons doivent être préparés en vue du contrôle microbiologique.

Pour l'échantillon liquide, il constitue la solution mère (SM) et si nécessaire des dilutions décimales sont réalisées dans un diluant stérile, et utilisées pour la recherche et le dénombrement de microorganismes selon les méthodes de dénombrement de (s) groupe (s) de microorganisme (s) à rechercher.

Quant à l'échantillon solide, celui-ci nécessite un broyage dans un diluant stérile à l'aide des broyeurs de laboratoire, cet ensemble (échantillon et diluant) constitue la dilution mère (DM), et si nécessaire d'autres dilutions décimales sont réalisées. Le titre des dilutions est calculé de la manière suivante :  $T = P/V$ , avec P est le poids et/ou le volume de l'aliment, V est le volume total de l'aliment plus le diluant. Dans les deux cas (solide et liquide) plusieurs rapports de dilution sont pratiqués (25 : 225, 10 : 90, 5 : 45, 3 : 27, 1 : 9, 0,5 : 4,5), dont le principe est le rapport 1 : 9. Une partie de l'échantillon, neuf parties de diluant.

#### 9.3.4. Standardisation de la suspension mère

La suspension mère est constituée par le produit brut lorsqu'il est liquide et par le produit de broyage dilué dans les autres cas.

Lorsque le produit est liquide le prélèvement pour la première dilution est effectué à la pipette, les résultats de l'analyse sont facilement rapportés au ml de produit brut.

Lorsque le produit n'est pas directement pipetable, qu'il subit une fluidisation ou un broyage, il est possible de procéder de deux façons :

- Pesée exacte d'une quantité donnée de produit par exemple 10g dans le récipient de broyage ou celui destiné à la première dilution et adjonction de la quantité nécessaire de diluant (40ml pour dilution au  $1/5^e$ , 90ml pour dilution au  $1/10^e$ ).

- Prélèvement dans le récipient de broyage ou de dilution d'une quantité approximative de produit et pesée de l'ensemble, la tare du récipient étant connue. L'adjonction du diluant s'effectue ensuite en fonction du poids relevé. Cette deuxième méthode est la plus pratique car elle permet de réaliser le prélèvement de façon rapide et donc dans les meilleures conditions d'aseptie.

Dans les deux cas la concentration de la suspension mère est parfaitement définie par rapport à l'aliment brut : **x** ml de suspension correspondent à **y** grammes d'aliment. Les résultats de l'analyse sont d'abord ramenés au **ml** de suspension, puis au **gramme** d'aliment.

#### 9.3.5. La revivification

Les micro-organismes sont souvent "endommagés" mais non tués au cours des traitements technologiques (déshydratation, chaleur, froid etc.) appliqués aux produits alimentaires ou par suite de leur vieillissement. Ces altérations se reflètent dans certaines de leurs propriétés physiologiques en particulier au niveau de leur phase de latence qui est augmentée ou de leurs besoins nutritionnels ou encore quant à leur sensibilité aux conditions de milieu défavorables (pH, sels biliaries, colorants, sels etc.).

En général ces altérations sont réversibles et après leur disparition les bactéries récupèrent leurs propriétés initiales, en particulier au niveau de leur croissance ou de leur pouvoir pathogène.

La nécessité de faciliter le « rétablissement » des cellules ayant subi des altérations sub-létales, c'est-à-dire leur « réanimation » ou encore leur revivification, s'impose avant de les soumettre à des milieux sélectifs souvent peu favorables à la croissance du fait de la présence d'inhibiteurs.

En effet, la présence de cellules endommagées peut entraîner des variations dans les numérations ou porter à croire qu'il n'y a pas ou peu de germes et donc pas ou aucun risque pour le consommateur. Ceci est particulièrement important quand il s'agit de déterminer si des micro-organismes pathogènes ou indicateurs sont présents ou non.