

Chapitre 3: prélèvement, transport et préparation des échantillons

Partie 2:

Échantillonnage

L'échantillonnage a pour but d'estimer les caractéristiques d'un lot en effectuant des analyses sur une partie.

Cette partie qui s'appelle échantillon doit répondre à deux conditions principales :

- ❖ **Représentatif du lot** : l'échantillon doit présenter, le plus possible, les mêmes caractéristiques du lot.
- ❖ Ne doit avoir **aucune modification quantitative ni qualitative de la flore microbienne avant ou pendant les analyses microbiologiques.**

Le prélèvement doit être effectué par du **personnel formé** aux techniques de prélèvements microbiologiques afin d'éliminer tout risque de contamination accidentelle du produit.

Le plan d'échantillonnage dépend de nombreux paramètres tels que **taille du lot, caractéristiques du produit, niveau de contamination présumé du produit, homogénéité de distribution des micro-organismes.**

- **Lot** : l'ensemble d'individus d'un produit de caractéristiques uniformes.
- **Échantillon** : une ou plusieurs unités d'échantillonnage prélevées.
- **Échantillon global** : l'ensemble des unités d'échantillons prélevés du même lot.
- **Échantillon pour laboratoire** : nombre réduit d'unités de l'échantillon global, de quantité représentative nécessaire pour analyse au laboratoire (cinq (5) unités pour l'analyse microbiologique, et trois (3) unités pour l'analyse physicochimique).
- **Non endommagé ou modifié** : l'échantillon doit être gardé protégé contre toute contamination provenant de l'environnement, et même conservé dans des conditions réduisant toute modification du nombre de microorganismes présents.

Selon les normes ISO et les normes algériennes (NA), la majorité des techniques utilisées pour l'échantillonnage des produits se présentant sous forme préemballée peuvent être résumées dans trois techniques :

- **Technique des pourcentages** : pour les lots considérés très importants (1 % s'agit d'un grand lot, 10 % lorsqu'il s'agit d'un lot plus au moins petit).
- **Technique de la racine carrée ($2\sqrt{}$)** : pour les lots considérés pas très grands ($2\sqrt{}$ de l'effectif du lot).
- **Technique de la racine cubique ($3\sqrt{}$)** : pour les lots considérés assez grands ($3\sqrt{}$ de l'effectif du lot).



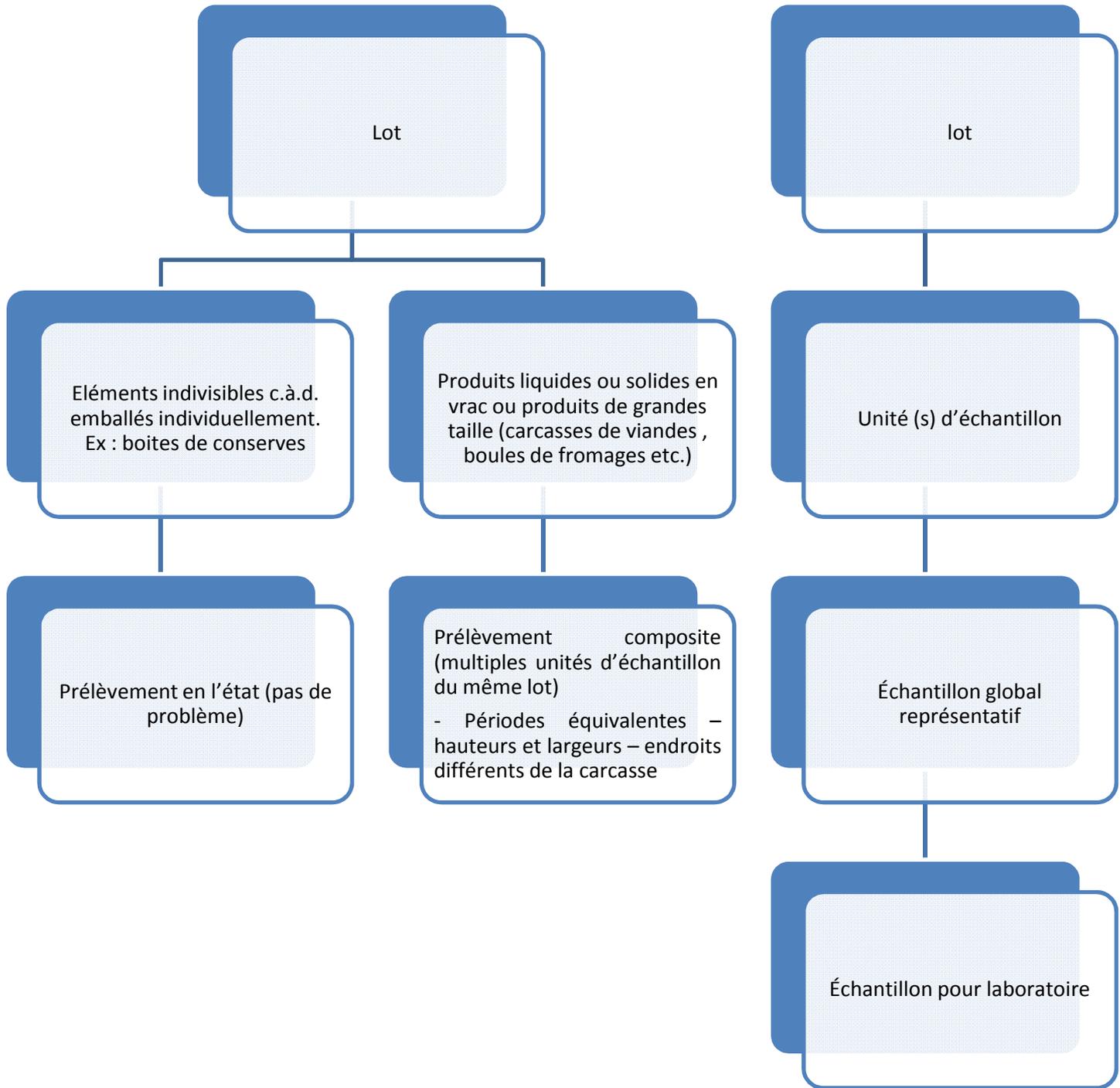
Conditions générales de
prélèvement

Homogénéité

Précautions d'aseptie

Stérilisation préalable et
sur place – flacons (taille
et orifices) adaptée au
volume de l'échantillon –
matière des récipients





- **Prélèvement des produits solides**

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

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

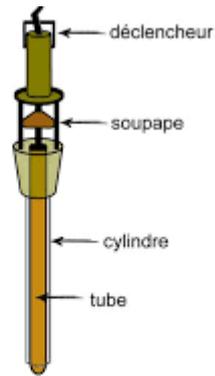


Figure 10. Carottier de type Kajak-Brinkhurst.
B.C. Ministry of Water, Land and Air Protection, 2003.)



Sonde à soupape des produits liquide en vrac



la sonde de fromage



sonde de produits solide en vrac



Le scalpel

Cas des aliments solides

Pour mieux expliquer la procédure d'échantillonnage des produits en vrac solide on prend l'exemple des grains, dont l'échantillonnage se fait avec le matériel suivant : grandes pelle et pelle à main (A) , sonde cylindrique (B)



- **Prélèvement en bateau** : se fait pendant l'opération de déchargement en plusieurs endroits et à des intervalles de temps déterminés, ainsi à partir de l'échantillon global, on réalise l'échantillon de laboratoire.
- **Prélèvement dans les citernes** (Wagons ou dans des camions) : se fait dans toute la hauteur de la couche à l'aide d'une sonde cylindrique, et à des endroits de prélèvement au centre et à environ 50 cm des parois (5, 8, 11 points de prélèvements).

Cas des aliments liquides

La procédure d'échantillonnage des produits en vrac liquides se fait à l'aide d'un échantillonneur de fond ou à soupape

Citernes (fixes, wagons, camions, navire) : se fait sur un produit homogène et à différents niveaux, et à partir de l'échantillon global on obtient l'échantillon de laboratoire. Si, le produit n'est pas homogène, on doit réaliser des prélèvements, séparés par intervalle de temps, de haut en bas.

- Dans le cas des citernes navires, l'échantillonnage s'effectue en cours de transvasement, par de prises fréquentes à intervalle régulier.

Remarque : L'échantillonnage doit être effectué, aseptiquement, avec les mains propres, ou avec des gants propres en latex, en se servant des récipients propres et stériles ou des sachets stériles ;

• Échantillonnage en surface

En règle générale on met la surface à analyser en contact avec un **diluant stérile**, puis on prélève la suspension microbienne ; Par **écouvillonnage (3)** de la surface, à l'aide d'un écouvillon qui est ensuite mis en suspension dans un diluant stérile, ou directement étalé sur un milieu gélosé ; Au moyen de **boites de contact (1)** ou **lames d'immersion (2)** remplies du milieu gélosé, qui est pressée contre la surface à soumettre à l'essai.



(1)



(2)



(3)

2. Transport et conservation des échantillons

- Depuis le prélèvement jusqu'aux analyses et contrôle, il faut prendre toutes les précautions pour stabiliser quantitativement et qualitativement la flore présente au moment du prélèvement.

- il faut **identifier immédiatement** le produit avec une étiquette ou une référence
- Noter la **température** initiale, **l'heure** du prélèvement, **la date** et la **température** de transport.
- Amener les échantillons le plus **rapidement** possible 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 (transport rapide et stockage bref).

- 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).
- L'échantillon peut être conservé (si nécessaire) pour une courte période à 4°-5°C. Cette température permet une stabilisation de sa charge microbienne avec une multiplication en ralentie des psychrotrophes.

3. Préparation des échantillons

1. la Prise d'essai:

- La fraction prélevée pour l'analyse doit être aussi représentative que possible pour un échantillon à analyser.
- La prise d'essai doit comporter des parties superficielles et des parties profondes.
- Elle doit se faire dans des conditions aseptiques (à côté d'une flamme).
- Le manipulateur doit s'aider des pinces, coteaux, spatules, scalpels.. , ces outils doivent être stériles et inoxydables (stérilisables à la flamme)

3. 2. Pesée

- La pesée de la prise d'essai doit être réalisé en condition aseptiques et rapidement pour minimiser le risque de contamination.
- La plus simple méthode c'est de :
- Tarer un récipient stérile
- Introduire aseptiquement une quantité suffisante pour la préparation de la suspension.

3.3. Broyage

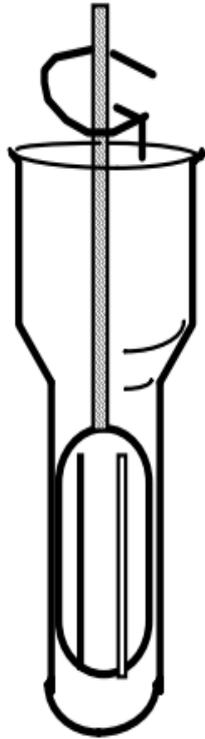
- Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera "homogénéisé" (liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile (solide) ce qui constitue en fait la première dilution.

Diverses techniques de “broyage” sont utilisables :

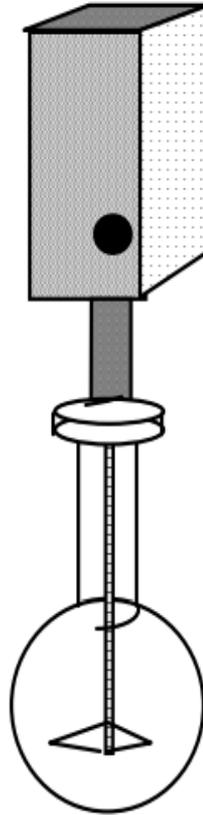
- 1) broyage manuel au Potter ou en présence de sable stérile ou de billes de verre (mortier)
- 2) broyage mécanique
 - avec un broyeur électrique à couteaux de type VIRTIS. Au cours du broyage les germes doivent être dispersés mais non détruits;
 - avec un broyeur du type STOMACHER. Cet appareil permet de disperser dans des conditions relativement douces l'aliment dans le diluant.



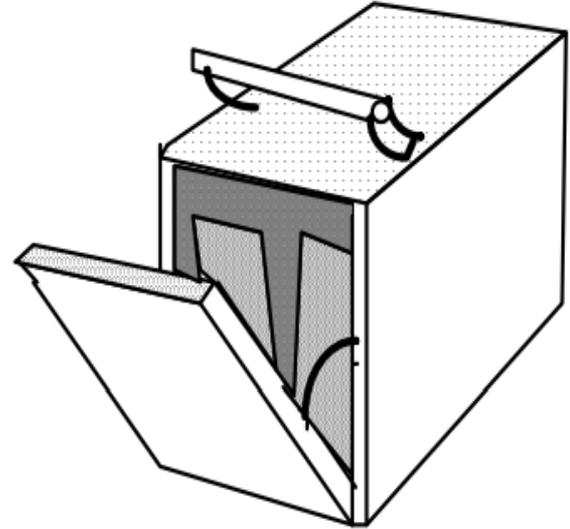
mortier et pilon



Broyeur de POTTER



broyeur type
VIRTIS



homogénéisateur type
Stomacher

Schéma de divers systèmes de broyage

- La prise d'essai est le plus souvent de 10 g (ou 25) d'aliment et de 90 ml (ou 250) de diluant.
- En microbiologie on considère 1g=1ml quelque soit la nature du produit à analyser

$$\text{Titre de la suspension} = \frac{\text{poids de l'échantillon}}{\text{volume de l'échantillon} + \text{volume de diluant}}$$

3.4. Dilution

- Le diluant utilisé en microbiologie ne doit pas induire des variations qualitatives ou quantitatives dans la flore microbienne.
- Il doit assurer la survie de tous les microorganismes mais ne doit pas favoriser leur multiplication.
- Actuellement il paraît souhaitable de réaliser les préparations et les dilutions des échantillons à analyser dans une solution de tryptone sel.

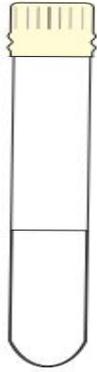
3. 5. technique de dilution

- Elles nécessitent la présence de nombreux tubes à essais contenant le plus souvent 9 ml de diluant stérile et de nombreuses pipettes stériles de 1 et 10 ml. Les pipettes peuvent être remplacées par des systèmes de pipetage automatique munis de cônes à usage unique.

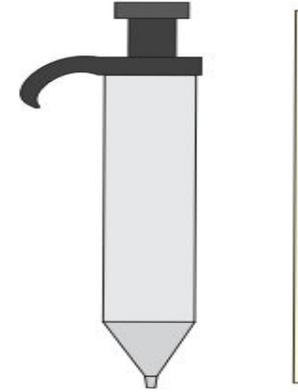
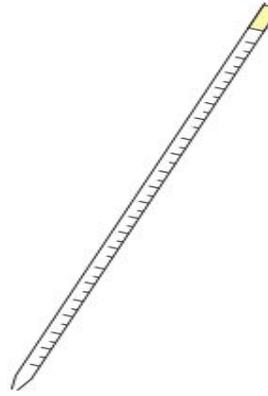
Toutes les manipulations sont à effectuer avec toutes les précautions d'asepsie exigées en microbiologie. L'introduction éventuelle d'un contaminant ou la contamination de l'opérateur doivent ne jamais se produire.

- Le récipient contenant le liquide à diluer est agité manuellement avec précaution pour éviter les projections pendant une dizaine de secondes. On prélève stérilement 1 ml de ce liquide (aspirer et refouler une fois avant le prélèvement) que l'on introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile. Le tube est agité par des mouvements de rotation ou au moyen d'un Vortex. On obtient ainsi une dilution au 1/10. Avec une nouvelle pipette de 1 ml on prélève 1 ml de cette dilution que l'on introduit dans un nouveau tube de diluant de 9 ml ; on obtient une dilution au 1/100 et ainsi de suite jusqu'au niveau de dilution recherché.

Le matériel :

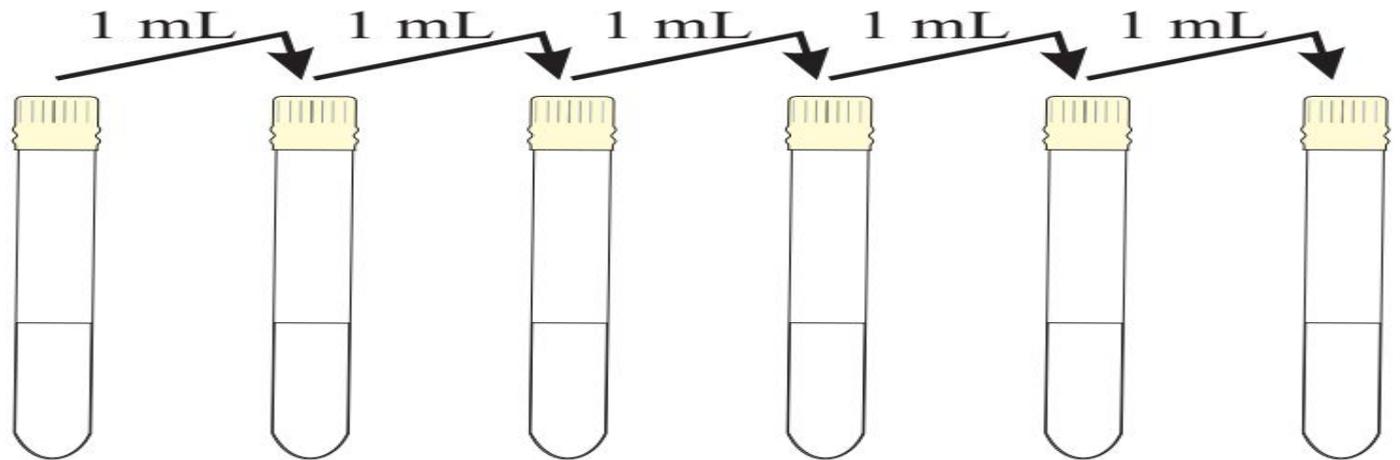


Tubes de diluant
de 9 mL



Pipette graduée ou pipette paille de 1 mL

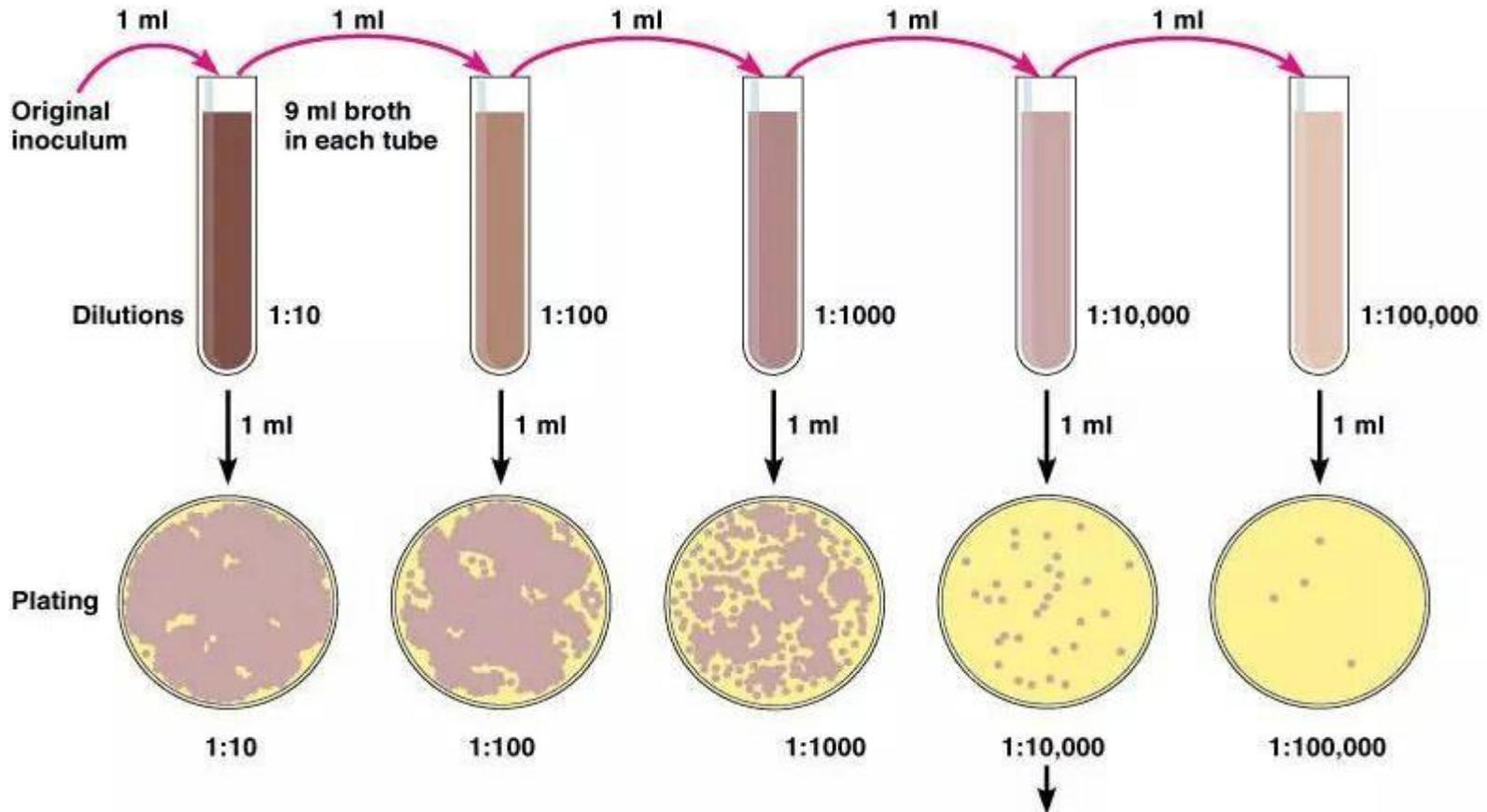
La technique :



Dilution :	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Facteur de dilution :	1	10	100	1000	10000	100000

Intérêt de la dilution

- Elle permet de faciliter le dénombrement



Calculation: Number of colonies on plate \times reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $1/10,000$ dilution, then the count is $32 \times 10,000 = 320,000/\text{ml}$ in sample.)