

Echantillonnage

1. Définition de l'échantillon

L'**échantillon** est un ensemble composé d'un ou plusieurs individus (ou une fraction de matière) sélectionnés de différentes façons dans une population (ou dans une importante quantité de matière). Il est destiné à fournir une information caractéristique de la population (ou de la matière) étudiée, et éventuellement à servir de base à une décision concernant cette population ou cette matière ou le procédé qui l'a produite.

Un **échantillon représentatif** est un échantillon dans lequel on retrouve les caractères du lot d'où il provient. C'est notamment le cas lorsque chacun des individus ou des prélèvements élémentaires à choisir dans le lot a la même probabilité de figurer dans l'échantillon (échantillon aléatoire simple).

Effectuez des prélèvements dans chaque quart de travail sur une base aléatoire afin que l'ensemble de la série des échantillons reflète l'échantillonnage des différents quarts. Les proportions de prélèvements des quarts de travail peuvent varier.

2. Taille d'échantillon

L'expression « taille d'échantillon » fait référence au nombre d'échantillons prélevés qui sont utilisés à des fins de caractérisation ou de calcul. Essentiellement, la détermination de la taille de l'échantillon relève du contexte de l'échantillonnage et des objectifs de précision ou de certitude à atteindre. La taille d'échantillon est influencée par les approches d'échantillonnage utilisées.

3. Conditions du prélèvement

- a- Le respect des règles **d'asepsie** (travail correct du microbiologiste). Dans la mesure du possible, les échantillons du produit à analyser doivent être amenés au laboratoire dans leur conditionnement d'origine, ce qui évite certaines contaminations. Certains instruments doivent être stérilisés sur les lieux du prélèvement. Le trempage dans l'alcool et le flamage sont parfois insuffisants car la température atteinte n'est pas assez élevée.
- b- Les bactéries et les champignons – selon leur type – sont capables de proliférer dans une large gamme de températures. C'est la raison pour laquelle les échantillons doivent être refroidis à des températures **inférieures à 5°C** le plus rapidement possible après prélèvement puis envoyés au laboratoire dans des sacs ou des récipients en plastique propres et stériles.
- c- La **représentativité** : Très schématiquement, la taille de l'échantillon d'un produit de même nature réparti en portions unitaires doit être au moins de 5 unités (lieu de fabrication ou de distribution), de 5 unités pour les conserves. Le laboratoire doit disposer d'environ 500 g de produits, soit 5 fois 100 g, ces 100 g pouvant être fournis par une ou plusieurs pièces.

4. Identification du lot d'échantillonnage

Un **lot** est une unité de production (batch) qui peut être identifiée par le même code.

Un lot peut être considéré comme étant : la quantité de produits qui constitue un ensemble distinct: même produit, même étiquette, même type de contenant, même format, fabriqué et/ou emballé dans des conditions identiques, dans le même établissement, et ne représentant pas plus que la production d'une journée;

5. Modalités d'échantillonnage

Les modalités des prélèvements ont fait l'objet de plusieurs textes réglementaires. Il existe deux modalités principales.

5.1. Échantillonnage ciblé

L'échantillonnage ciblé consiste généralement à prélever des échantillons à des endroits où l'on soupçonne la présence de contaminants.

Il est également possible d'effectuer un échantillonnage ciblé afin de démontrer l'absence de contamination dans un secteur donné.

Très souvent, les observations visuelles ou les données provenant d'une enquête ou de plaintes guident le préleveur vers la zone appropriée. Cette approche d'échantillonnage est largement utilisée, mais elle n'apporte généralement que peu de renseignements sur la contamination moyenne d'un secteur donné.

5.2. Échantillonnage aléatoire (au hasard)

L'échantillonnage aléatoire consiste à prélever des échantillons à des endroits choisis au hasard, de telle sorte que chaque point d'échantillonnage a la même probabilité d'être sélectionné.

5.2.1. Échantillonnage aléatoire simple

L'échantillonnage aléatoire simple consiste à prélever des échantillons à des endroits choisis au hasard sur le terrain, lorsqu'il s'agit d'un milieu statique (Échantillon ponctuel) (sol, résidus solides, etc.), ou à des périodes de temps choisies au hasard, lorsqu'il s'agit d'un milieu dynamique (Échantillon instantané) (rejets liquides, cours d'eau, convoyeur, etc.). Ce type d'échantillonnage permet d'évaluer la contamination moyenne d'un milieu ou d'un résidu.

5.2.2. Échantillonnage systématique

L'échantillonnage systématique consiste à sélectionner un premier point au hasard et à y ajouter une unité de longueur ou de temps choisie à l'avance. Cette unité ne peut être modifiée par la suite afin de préserver le caractère aléatoire de l'échantillonnage.

Plan d'échantillonnage

Les germes sont classés en fonction du risque qu'ils font courir au consommateur en :

- Germes entraînant un **risque sévère** (*Clostridium botulinum*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* type C, virus de l'hépatite A).
- Germes entraînant un **risque moyen avec possibilité de large diffusion** (Staphylocoques entérotoxigènes, *Salmonella typhimurium* et les autres sérotypes, autres *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* entéropathogènes, Streptocoques b hémolytiques).
- Germes entraînant un **risque moyen sans grande diffusion** (*Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Clostridium perfringens*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, etc..).

Notion du critère en alimentaire

Pour chaque produit alimentaire, un critère publié au journal officiel fixe la limite entre l'admissible et le non admissible pour chaque catégorie de microorganisme.

Il existe deux types de critères :

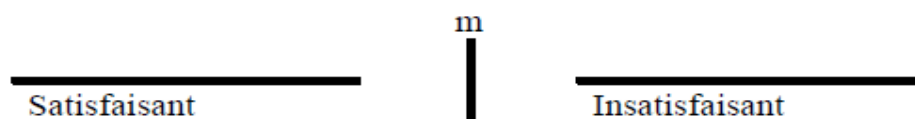
- Critère non chiffré : absence de microorganismes dans une masse ou un volume du produit.
- Critère chiffré : x microorganismes dans une masse ou un volume du produit.

Plan d'échantillonnage

L'échantillonnage microbiologique est exprimé en fonction de plans à deux classes ou à trois classes, selon le niveau de risque.

Plan d'échantillonnage à deux classes

Les échantillons analysés sont divisés en deux catégories: *satisfaisant et insatisfaisant*, basées sur une valeur limite « m=0 » (Ce type de plan n'accepte aucune tolérance), tel que *Salmonella* *Listeria*.



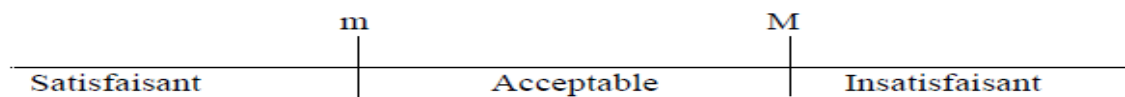
Conclusions :

- *absence dans* (satisfaisant)
- ou encore *présence dans* (impropre à la consommation).

Plan d'échantillonnage à 3 classes

Ce plan est basé sur la reconnaissance de 3 catégories d'échantillons en fonction du niveau et de contamination : *satisfaisant, acceptable et insatisfaisant*.

Un plan d'échantillonnage à trois classes est utilisé s'il est acceptable que certains échantillons dépassent la limite inférieure (m) dans la mesure où un niveau de contamination à risque (M) n'est pas dépassé.



Les symboles utilisés dans les plans et leurs significations sont les suivants :

n représente le nombre d'unités constituant l'échantillonnage (en général 5).

c représente le nombre maximal permis d'unités prélevées de qualité marginale. Si le nombre d'unités de qualité marginale est supérieur à **c**, le lot dont provient l'échantillon est inacceptable/insatisfaisant.

m la valeur numérique de « m » représente des concentrations satisfaisantes en microorganismes (fixée par la réglementation).

M seuil Maximum ou limite d'acceptabilité

M= 10m pour milieu solide.

M= 30m pour milieu liquide

Qualité microbiologique conforme

Le résultat analytique est inférieur à « m ».

Lorsque les valeurs observées pour les 5 unités d'échantillon sont < m

Qualité microbiologique médiocre/acceptable

Le nombre d'échantillon supérieur à « m » sans dépasser le « M » doit être inférieur ou égal à « c ». Le profil microbiologique de l'aliment se situe près des critères satisfaisants, mais laisse entrevoir des lacunes à corriger (application des bonnes pratiques de fabrication (BPF)).

Lorsque les valeurs observées pour au plus c unités d'échantillon sur n sont comprises entre m et M. Les autres échantillons doivent être < m

Qualité microbiologique non conforme

Cette conclusion s'applique lorsque le résultat analytique est supérieur à « M » ou si le nombre d'échantillons de qualité médiocre est supérieur à « c » (plus de c échantillons sur n donnent un résultat supérieur à m).

Les unités d'échantillonnage présentant un résultat de moins de « m » sont satisfaisants ou de bonne qualité bactériologique. Les unités révélant un résultat entre « m » et « M » sont jugées comme étant acceptables (médiocres), et les unités renfermant des comptes supérieurs à « M » sont insatisfaisants (non conformes).

Paramètres à contrôler

Deux types de prélèvement sont effectués en pratique :

- Prélèvement **d'échantillon alimentaire** sur lequel sera effectuée une analyse microbiologique réglementaire, afin de rechercher la présence éventuelle de germes pathogènes mais également la présence de germes dits « indicateurs ».
- Prélèvement **de surface** pour vérifier l'efficacité des opérations de nettoyage et de la désinfection sur les plans de travail et les ustensiles ou pour vérifier l'efficacité du lavage des mains du personnel.
- Prélèvement de l'aire pour vérifier la charge globale

1) Prélèvement en surface

Ecouvillonnage

Un écouvillon de coton hydrophile est immergé dans une solution stérile (eau physiologique). Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface du produit ; l'écouvillon est alors immergé dans 10 ml de la solution stérile.

L'analyse est réalisée à partir de la suspension ainsi obtenue.

Rinçage

Cette méthode est utilisée dans le cas de récipients ou de tuyauteries; un volume connu de solution stérile est introduit dans le matériel à analyser. Après agitation, le liquide est récupéré et soumis à l'analyse.

Méthode des empreintes

Un ruban adhésif préalablement stérilisé par les UV est appliqué sur la surface à étudier. 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.

2) Prélèvement de produits liquides

Il faut toujours s'assurer de la parfaite **homogénéisation** du liquide (agitateurs) avant de prélever à la pipette le volume nécessaire à l'analyse.

3) Prélèvement de produits solides

Selon le produit, le prélèvement sera effectué au scalpel, à la sonde (fromages et produits mous) ou à la pipette harpon.

La surface est souvent éliminée avant de procéder au prélèvement. Si le produit est hétérogène (plats cuisinés, conserves etc.) il faut s'assurer de la bonne représentativité du prélèvement.

La **prise d'essai** destinée à la préparation de la suspension mère et de ses dilutions doit correspondre

Pour les produits solides aux parties superficielles et profondes notamment pour les produits en tranche, hachés, divisés et les plats cuisinés par exemple.

Pour les produits liquides elle est effectuée sur le produit "homogénéisé"

Dilution et Dénombrement

1. 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: ainsi *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 et pour *Escherichia coli* dans de l'eau salée à 8,5‰.

Les diluants utilisés en général : eau physiologique, eau distillée, eau peptonée temponée.

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

2. La dilution

Effectuer « une gamme de dilutions » est une opération de routine dans l'étude de toutes les sciences exactes (physique, chimie, biologie, médecine, ...). Pour une substance donnée, elle permet d'étudier « l'effet-dose » c. à d. la relation entre décroissance de la dose (=concentration) et l'effet mesuré. En microbiologie, les gammes

de dilutions sont indispensables pour dénombrer les microorganismes dans un prélèvement dans lequel leur densité est trop importante.

a- But

Un produit peut contenir de très nombreuses bactéries, par exemple : 290000 par cm³.

On comprendra facilement que 1cm³ de produit, placé dans un milieu de culture d'une boîte de pétrie, ne permettra pas de compter les 290000 colonies bactériennes que l'on devrait attendre, ce qui sera visible c'est une nappe rassemblant toutes les colonies

Il est donc nécessaire de diluer, par exemple 1/1000, auquel cas on observera environ 290 colonies sur le milieu.

b- Consigne de technique

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.

c- Principe

Diluer une solution/suspension contenant une substance donnée soluble/insoluble ou des microorganismes (virus, bactéries, microchampignons, protozoaires), consiste à faire décroître sa concentration ou leur nombre suivant une progression géométrique de raison 2, 5, 10, 100 ou 1000 qui fournissent respectivement un coefficient (= taux) de dilution au 1/2, 1/5, 1/10, 1/100 ou au 1/1000. En fonction de l'échelle de gamme choisie, après une soigneuse homogénéisation on reporte de tube en tube l'aliquot voulu dans une série de tubes contenant le volume de diluant adéquat. Le diluant est un solvant (eau, alcool, etc ...), un émulsifiant (gomme, mouillant, etc ...). Après chaque report d'aliquot, le contenu du tube est homogénéisé par une violente agitation réalisée généralement sur un agitateur électrique de type Top-Mix® tournant à 2400 t/mm. Ce protocole peut être adapté pour diluer des poudres en milieu solide, avec un mortier et son pilon.

On parle dilutions aux 1/10^{èmes}

Nous avons : - dilution 1/10 ou 10⁻¹

- dilution 1/100 ou 10⁻²

Jusqu'à - dilution 1/1000000 ou 10⁻⁶ (en général en microbiologie alimentaire)

d- Techniques de dilution

Première étape: préparer une suspension mère

- prélèvement liquide : le prélèvement constitue la suspension mère

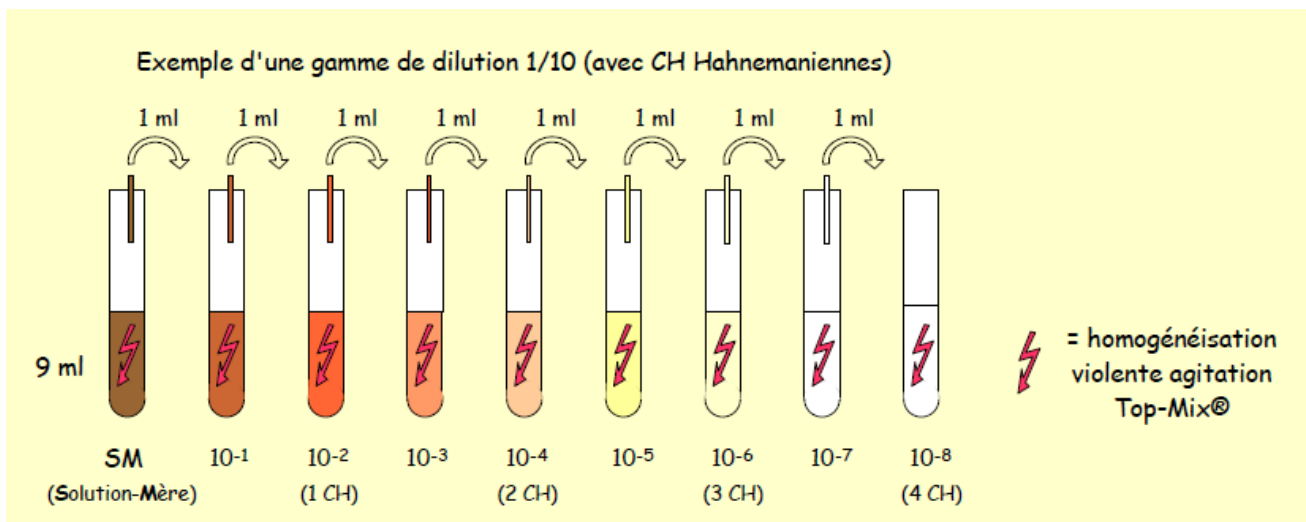
- prélèvement solide : ajouter au prélèvement un liquide stérile et bien homogénéiser

Deuxième étape

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.

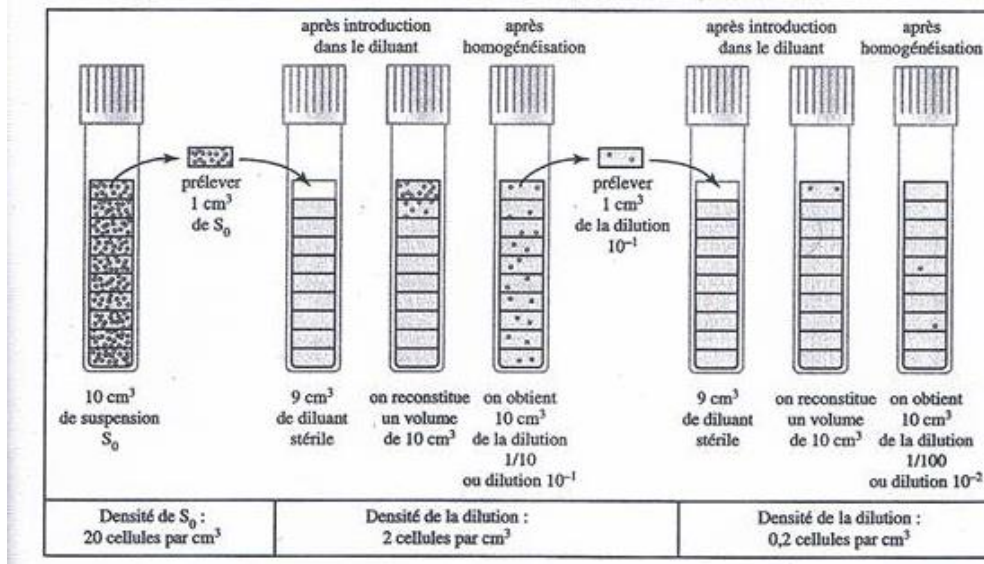
Le tube est agité par des mouvements de **rotation** ou au moyen d'un **Vortex**. On obtient ainsi une dilution au 1/10^{ème}.

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.



Troisième étape

Déposer 0,1 mL de la suspension mère sur la surface d'une gélose nutritive stérile et sèche.



Quatrième étape

Utiliser un étaloir stérile pour étaler la suspension sur toute la surface de la gélose.

Important: utiliser la même pipette et le même étaloir si vous commencez par la dilution 10^{-2} , ensuite 10^{-1} et à la fin la suspension mère.

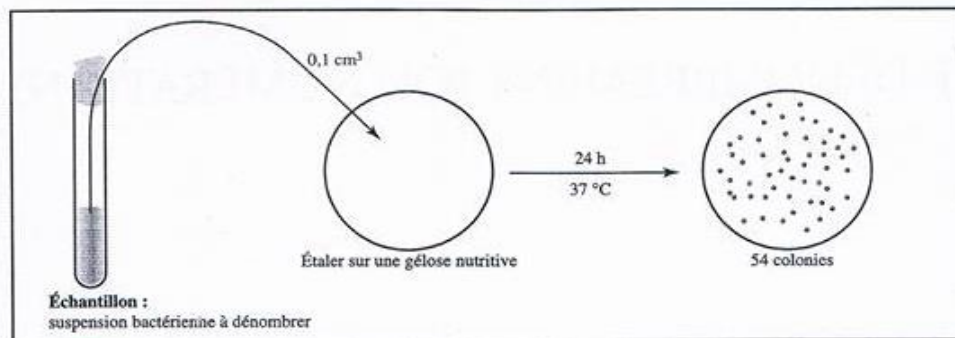
Changer la pipette et stériliser l'étaloir si vous commencez par la suspension mère.

3. Dénombrement

3.1. Interprétation de résultats



| | Suspension mère | Dilution 10 ⁻¹ | Dilution 10 ⁻² |
|---|---|--|--|
| Volumeensemencé en mL | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Nombre de colonie par surfaceensemencée et par dilution | Supérieure à 300 colonies : impossible de compter | Supérieure à 300 colonies : difficile de compter car risque de compter une colonie deux fois ou plus | Entre 30 et 300 colonies soit : 80 colonies |
| Nombre de colonie par dilution | Boite éliminée | Boite éliminée | 80 colonies X 10 = 800 |
| Nombre de colonie par millilitre de la suspension mère | Boite éliminée | Boite éliminée | 800 X 10 ² = 80000 = 8 10 ⁴ |



On admet qu'il y avait $n = 54$ bactéries revivifiables dans l'inoculum de $0,1 \text{ cm}^3$ de suspension.

On exprime le résultat du dénombrement en rapportant le nombre de micro-organismes à l'unité de volume de l'échantillon inoculé.

$N = n / V$ avec N : nombre de micro-organismes par cm^3 d'échantillon
 n : nombre de colonies dénombrées
 V : volume de l'inoculum (en cm^3)
 $N = 54 / 0,1$ Résultat du dénombrement : 540 bactéries par cm^3 de suspension.

L'observation microscopique révèle que dans un prélèvement les micro-organismes sont souvent groupés (bactéries par 2, en amas, chaînettes, levures comportant des bourgeons ...). Les cellules groupées donnent une seule colonie. Il est donc plus rigoureux d'exprimer le résultat en nombre d'« UFC » par cm^3 (UFC pour unité formant colonie).

- Multiplier le nombre de colonie compté sur la dilution retenue pour le dénombrement par 10 pour déterminer le nombre de colonie par mL si le volumeensemencé est de 0,1 mL.
- Multiplier ensuite le nombre trouvé par le taux de dilution retenue pour calculer le nombre de colonie par 1 mL de la suspension mère.
- Équation à appliquer = Nombre de colonie compté sur la boite retenue x Volume total de la dilution qui a servi au dénombrement x Taux de dilution
- Expression des résultats : comme une colonie peut provenir d'une seule cellule bactérienne ou de plusieurs cellules bactériennes (1streptocoque par exemple est composé de plusieurs cocci, il donne une seule colonie), on exprime le résultat final par le nombre d'unités formant colonies par mL et non par cellules par mL.
- Le nombre est donc: $8 \cdot 10^4$ UFC/mL de la suspension mère.

3.2. Intérêt du dénombrement

En microbiologie alimentaire l'intérêt de l'étude à la fois quantitative et qualitative de la flore présente dans un aliment est considérable. Bien que de nombreuses techniques de numération soient utilisables, il n'existe pas à l'heure actuelle de technique parfaite.

Dénombrer c'est déterminer le nombre de microorganismes dans une unité de volume d'échantillon (1ml d'échantillon solide) ou dans une unité de masse (1g d'échantillon solide).

Pour les microorganismes unicellulaires (bactéries, levures), l'activité est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes, d'où l'intérêt de les dénombrer.

Les dénombrements sont des opérations usuelles dans le domaine de microbiologie alimentaire :

- Dénombrement de certains microorganismes utiles assurant la transformation d'un aliment
- Ou dénombrement de microorganismes néfastes responsables des altérations des aliments ou représentant un danger pour le consommateur.
- On réalise aussi des dénombrements de microorganismes pour les contrôles d'hygiène dans les secteurs industriels (alimentaire, pharmaceutique et cosmétiques). Et aussi dans le secteur de santé (analyses médicales)

3.3. Principales techniques de numération

- Numération à partir d'un milieu solide : UFC

Sur milieu solide chaque cellule microbienne donne après culture, une colonie. Lorsqu'on obtient des colonies isolées, le nombre de colonies correspond au nombre de microorganismes présents dans l'inoculum et susceptibles de se multiplier.

L'inoculum correspond au volume ensemencé dans le milieu, il doit être connu de manière précise.

a. Technique de numération dans la masse de la gélose

- Les milieux gélosés sont liquéfiés au bain-marie bouillant ou mieux au four à micro-ondes, puis maintenus en surfusion dans un bain-marie à $45 \pm 1^\circ\text{C}$. 1 ml du liquide dans lequel on veut connaître le nombre de microorganismes est introduit au centre de la boîte de Pétri posée bien à plat dans la zone de protection du bec Bunsen.
- L'inoculum peut être réparti en gouttes sur le fond de la boîte (en double).
- Retirer le milieu du bain marie à 45°C , essuyer le récipient, l'ouvrir aseptiquement, flamber son ouverture et couler le milieu dans la boîte de Pétri contenant l'inoculum après l'avoir entrouverte dans la zone stérile.
- Mélanger rapidement par agitations en 8.
- Laisser refroidir les boîtes bien à plat jusqu'à solidification complète (environ 30 minutes).
- Retourner les boîtes et les placer à l'étuve dans cette position à la température requise.

b. Technique de numération en surface de la gélose

- Couler le milieu adéquat en boîtes de pétrie stériles.
- 100 microlitres (pipette graduée ou mieux pipette automatique) de l'échantillon à analyser sont généralement déposés à la surface de la gélose et immédiatement répartis de façon uniforme à la surface du milieu au moyen d'une pipette râteau (en double).
- Laisser sécher 15 minutes à température du laboratoire.
- Incuber à température et temps adéquat.

c. Utilisation de dispositifs spéciaux « Pétrifilms »

Les pétrifilms sont composés d'une mince pellicule de gélose déshydratée, située entre deux films plastiques souples, c'est un système quadrillé facilitant ainsi le dénombrement.

- Placer le pétrifilm sur une surface plane et soulever le film supérieur.
- Déposer 1ml de la suspension à analyser au centre et recouvrir avec le film.
- Etaler l'échantillon en exerçant une légère pression, ainsi la gélification du milieu déshydraté est obtenu en 2 min.
- Incuber à température et temps adéquat (si des températures supérieures à 100°C sont utilisées, un béccher d'eau est mis en parallèle dans l'étuve).

Lecture

Sont prises en considération les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies pour les bactéries, et entre 10 et 150 pour les levures et les moisissures.

Interprétation des résultats

- Choisir la dilution la plus significative
 - Équation à appliquer = Nombre de colonies compté sur la boîte retenue (ou la moyenne) x l'inverse de la dilution sur le volume ensemencé.
 - Expression des résultats : comme une colonie peut provenir d'une seule cellule bactérienne ou de plusieurs cellules bactériennes, on exprime le résultat final par le nombre d'UFC/mL de la suspension mère (ou produit liquide), ou UFC/g de produit solide.
-
- **Numération en milieu liquide**

En milieu liquide une seule cellule bactérienne vivante suffit pour donner le trouble. Si l'inoculum contient plus d'une cellule on obtient aussi le trouble.

Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche) ou la fermentation des sucres par virage de l'indicateur du pH.

Cette méthode repose sur le fait qu'un inoculum contenant au minimum 1 germe (UFT) donnera, après introduction dans un milieu liquide donné, une culture positive.

Dans cette technique, la disponibilité des nutriments pour le micro-organisme est excellente.

Méthode de Mac Grady (technique du nombre le plus probable NPP)

Cette méthode est une estimation statistique du nombre de microorganismes supposés être distribués dans un milieu de manière aléatoire. C'est une numération de la charge microbienne comprise entre 0 et 100 germes par ml.

Dans ce cas 1 ml de la suspension mère puis de ses dilutions est introduit dans des tubes contenant le milieu de culture choisi mais en réalisant chaque essai en double (ou en triple ou plus) suivant le niveau de précision souhaité).

Avec l'essai comportant deux tubes ensemencés par dilution on note, après incubation, les réponses positives ou négatives.

Il existe des tables Mac Grady pour les essais à 2, 3 ou à 5 tubes avec des volumes d'inoculum de 1, 10 et même 50 ml.

Avec l'essai comportant trois tubes ensemencés par dilution on note, après incubation, les réponses positives ou négatives et on affecte :

- le chiffre 3 à trois tubes positifs ensemencés avec la même dilution
- le chiffre 2 à deux tubes positifs ensemencés avec la même dilution
- le chiffre 1 si l'un des deux tubes donne une réponse positive à une dilution donnée
- le chiffre 0 si la culture est négative pour les deux tubes.

- Grouper en nombre de 3 chiffres la suite des chiffres obtenue, en commençant par le chiffre obtenu pour la plus faible dilution.

- Choisir le nombre le plus grand possible et si possible inférieur à 330 (car cela correspond à une meilleure répartition dans les dilutions).
- Lire la valeur correspondante n dans la table.

En déduire :

$$\text{Nombre bactéries} = \frac{n}{\text{valeur de la dilution correspondant au premier chiffre (centaines)} \times \text{volume ensemencé}}$$

Les résultats s'expriment en UFT ou NPP.

Procédure d'analyses microbiologiques

Le contrôle microbiologique fait appel à des techniques plus au moins rapides pour rechercher des germes ou pour les dénombrer.

I. Etude microscopique

L'examen microscopique est le plus souvent réalisé sur le prélèvement brut. Il s'effectue à l'état frais et/ou sur des frottis colorés. Les résultats de cette étude ne sont pas très fiables mais pour leur rapidité, ils peuvent être utiles pour :

- Estimer la flore totale (viable ou morte si des colorants vitaux sont utilisés comme le bleu méthylène ou le vert Janus) ou de la charge microbienne initiale d'un aliment.
- Mettre en évidence des contaminants dans la flore de fabrication par exemple présence de bactéries dans les ferments lactiques.
- Dénombrement des levures à l'aide d'un hématimètre (exemple, la cellule de Malassez)
- Recherche présomptive du bacille tuberculeux par la méthode de Ziehl-Nielson.
- Etude cytologique du lait pour la détermination de la formule leucocytaire pour avoir une idée sur l'état sanitaire de l'animal dont provient le lait.
- Recherche des parasites : elle permet de mettre en évidence les protozoaires (Toxoplasme, amibes) les nématodes (Ascaris) et les cestodes (Taenia) par la préparation de frottis colorés.

II. Culture (analyse qualitative et quantitative)

1. Principes

En raison des dimensions généralement très faibles des microorganismes et de leur répartition irrégulière dans une denrée alimentaire, il n'est généralement pas facile de détecter ces cellules directement, de les dénombrer et de les identifier. C'est pourquoi on a le plus souvent recours à 2 techniques pour établir leur présence de façon indirecte : la multiplication et l'inhibition

1.1 Multiplication

Lorsqu'un micro-organisme se trouve dans des conditions optimales pour son développement et sa multiplication (température, pH, substances nutritives, ...), le temps nécessaire au dédoublement d'une seule

cellule peut être très court, de 20 à 30 minutes à quelques heures. Ainsi, si une cellule a un temps de dédoublement de 1h, elle donne naissance après 24h à 16 millions de cellules. De ce fait, une seule cellule, invisible à l'œil nu, peut donner naissance après quelques heures de développement illimité, à des dizaines de millions de descendants.

Dans un fluide, ceci se manifeste par un aspect trouble,

Sur une surface solide, cela entraîne l'apparition d'un petit amas (colonie) de cellules visible à l'œil nu (faire développer une cellule en une colonie visible est l'un des principes de base des analyses microbiologiques classiques).

A cet égard, il convient de bien faire remarquer que l'hypothèse selon laquelle chaque colonie visible provient d'une seule cellule ne représente pas la réalité. Souvent il est impossible de séparer entièrement les cellules l'une de l'autre pendant l'analyse, si bien qu'une colonie peut se former à partir d'un petit groupe de cellules, et non pas d'une seule cellule (par ex. staphylocoques, qui se trouvent par nature en petits groupes). De là vient l'expression d' 'unité formant colonie' (ufc, cfu – colony forming unit) et non pas de 'cellule formant colonie'.

1.2 Inhibition sélective

Dans un échantillon, il y a généralement de nombreuses espèces différentes de microorganismes, dont un nombre limité seulement est important, (pathogène spécifique ou indicateurs). Pour sélectionner l'organisme ou le groupe recherché, on doit, d'une part, appliquer les conditions de développement auxquelles les organismes recherchés peuvent se multiplier, et d'autre part, freiner (inhiber) le développement d'autres organismes qui pourraient gêner l'analyse, de telle sorte qu'après un certain temps, l'organisme recherché prenne le dessus sur tous les autres :

- Contrôle de l'atmosphère (aérobies – anaérobies), du pH, de la température de développement,
- Substances nutritives spécifiques,
- Composés inhibiteurs tels que les antibiotiques, les sels...

Ces paramètres doivent évidemment être contrôlés de telle manière que la croissance de l'organisme recherché en soit le moins possible perturbée.

2. Dénombrement et détection

Dans une analyse microbiologique, on peut poser deux questions :

- Combien de cellules d'un organisme donné sont présentes dans une quantité donnée d'échantillon ? C'est important lorsqu'une limite maximum a été fixée à la présence d'un organisme ou d'un groupe donné dans un produit (ex. : moins de 100 par gramme).

On doit effectuer un DENOMBREMENT ; on commence par disperser (diluer) les cellules pour les séparer, après quoi on laisse ces cellules se développer en colonies et on compte le nombre de colonies caractéristiques.

Donc d'abord disperser, ensuite multiplier.

- Un organisme donné est-il présent dans une quantité donnée d'échantillon ? C'est le cas pour les pathogènes, pour lesquels a été fixée une norme disant que l'organisme doit être absent dans une quantité donnée de l'échantillon (par ex. absent dans 25 g de produit).

On procède à une détection de l'organisme dans la quantité en question de l'échantillon. Comme le nombre de cellules présentes n'est pas important (peu importe s'il y en a 1 ou 100 dans la quantité donnée du produit), on procède d'abord à un enrichissement, et ensuite à une confirmation pour voir si l'organisme est bien présent.

Donc d'abord multiplier et ensuite confirmer.

3. Techniques microbiologiques standards

Dans l'analyse microbiologique, on applique une série de techniques standards; une méthode d'analyse microbiologique (classique) est une combinaison dans un ordre bien déterminé de techniques, axé sur l'organisme ou le groupe d'organismes à analyser. On trouve ci-après un aperçu de ces techniques.

Etant donné que les germes pathogènes sont des germes fragiles et qu'ils sont les plus souvent retrouvés en faible nombre dans les produits alimentaires, il est donc important d'augmenter les chances de leur détection. L'enrichissement consiste à mettre en contact l'échantillon avec un milieu de culture qui va favoriser la croissance du germe recherché et augmenter son nombre. (opération qui modifie le nombre initial de germes).

3.1 Enrichissement non sélectif

But : multiplier un petit nombre d'organismes présents dans un échantillon pour obtenir un grand nombre d'organismes afin de pouvoir déterminer facilement leur présence.

Principe : mettre une prise d'essai de l'échantillon (homogénéisé) dans un milieu nutritif liquide et l'incuber à un certain temps dans les conditions optimales de développement.

3.2 Pré-enrichissement

But : donner la possibilité aux organismes stressés (revivification des germes en mauvais état physiologique, ex. après un choc de température) de récupérer afin qu'ils puissent tolérer les conditions de stress aux étapes suivantes (surtout la présence des substances inhibitrices).

Principe : mettre une prise d'essai de l'échantillon (homogénéisé) dans un milieu nutritif liquide et le conserver un certain temps (souvent < 24 h) dans les conditions optimales de développement. Le milieu est non-sélectif ou faiblement sélectif, ceci (avec le court temps d'incubation) pour éviter la croissance d'autres organismes.

3.3 Enrichissement sélectif

But : multiplier un petit nombre d'organismes présents dans un échantillon pour obtenir un grand nombre d'organismes afin de pouvoir déterminer facilement leur présence, mais de telle manière que cette multiplication ne concerne que l'organisme ou le groupe recherché.

Principe : réalisation d'un enrichissement, mais dans un milieu nutritif liquide qui contient des substances inhibitrices qui entravent le développement des autres organismes (p.ex. sels biliaires dans le cas de coliformes). De ce fait, ce sont surtout les organismes recherchés qui vont se multiplier.

3.5 Etalement non sélectif

But : étaler les cellules individuelles contenues dans une quantité d'échantillon sur un milieu nutritif solide, de telle sorte que ne puisse se développer à partir de chaque cellule qu'une colonie particulière distincte des autres colonies.

Les colonies particulières peuvent soit être dénombrées, soit servir de matériel de départ pour la suite de l'analyse.

Principe : une quantité de milieu de dilution (p.ex. 0,1 ml) est étalée sur un milieu nutritif solide, généralement dans une boîte de Petri. Ce milieu se compose de gélose – un polysaccharide qui ne se dégrade pas et sert donc de matrice solide. Pendant le développement, toutes les cellules issues d'une seule cellule restent au contact de cette première cellule;

Le développement peut entraîner des changements dans le milieu nutritif (acidification, dégradation de certains composants, ...) qui peuvent se manifester par des changements de couleur etc. autour de la colonie (changement du pH par la formation d'acides comme produits de dégradation lors du développement, le dépôt de FeS noir lors de la dégradation d'acides aminés sulfureux. De ce fait apparaissent des colonies ayant un aspect caractéristique (couleur, aspect, brillance, zone...), que l'on peut distinguer des colonies provenant d'autres organismes que l'organisme recherché.

3.6 Etalement sur milieu sélectif

But : étalement sur un milieu auquel ont été ajoutées une ou plusieurs substances inhibitrices afin d'empêcher le développement de groupes d'organismes indésirables (par ex. : sels biliaries en cas de coliformes).

3.7 Isolement d'une colonie

But : s'assurer qu'une colonie qui va servir à confirmer la nature de l'organisme provient effectivement d'une seule cellule et n'est donc pas un mélange de deux ou plusieurs organismes différents.

Principe : dans le cas idéal, une colonie isolée sur une boîte provient d'une seule cellule et toutes les cellules de cette colonie en sont des clones. En pratique, il peut se trouver à proximité de cette cellule des cellules d'autres organismes, qui dans les conditions données ne se développent guère voire pas du tout, mais qui ne meurent pas non plus. Si l'on repique cette colonie sur un autre milieu nutritif (par exemple pour identification), on court le risque que ces cellules 'étrangères' se développent et faussent le résultat des tests. C'est pourquoi il est nécessaire de commencer par isoler une colonie après développement avant de procéder aux tests supplémentaires. Pour ce faire, on repique une colonie isolée sur un autre milieu, généralement non sélectif (ensemencement par stries).

La boîte est incubée jusqu'à ce qu'apparaissent des colonies distinctes, et on continue l'analyse avec une de ces colonies isolées. Les chances qu'une colonie après isolement soit encore contaminée par une cellule étrangère sont alors devenues très minimes.

3.8 Confirmation

But : contrôler si la colonie isolée est effectivement l'organisme recherché ou déterminer l'identité d'une colonie isolée (généralement au niveau de l'espèce).

Principe d'une confirmation biochimique : un certain nombre de tests biochimiques est effectué sur une colonie isolée. A cette occasion, on contrôle le développement dans différentes conditions et sur différents milieux nutritifs afin de vérifier s'il se produit des réactions typiques telles qu'acidification, fermentation de certains sucres, dégradation d'un composé donné, etc.

Le tableau des réactions ou l'utilisation de la galerie API permet de déduire si l'on est en présence de l'organisme recherché ou d'identifier un organisme (espèce) à l'intérieur d'un groupe (par ex. déterminer l'espèce à l'intérieur du genre *Listeria*).

3.10 Sérotypage

But : l'identification d'un organisme à un niveau inférieur à celui de l'espèce (détermination de sérovars).

Principe : dans ces tests, on mélange une colonie avec des anticorps spécifiques à certains composants cellulaires (paroi cellulaire, flagelle, ...). L'agglutination indique la présence de ces composants.

Le sérotypage est plus précis que les tests biochimiques (niveau du sérovar plutôt que de l'espèce).

Le sérotypage est effectué d'une part pour déterminer d'où vient une contamination (comme pour les sérotypes de Salmonella) et d'autre part pour déterminer la présence de facteurs de virulence et aussi la possibilité de provoquer une maladie (comme la présence de l'antigène H7 chez E. coli O157).