

## 1. Analyse microbiologique des boissons non alcoolisées

Les boissons non alcoolisées sont essentiellement des produits à base de fruits ou de légumes non fermentés. On distingue plusieurs catégories.

- ✓ Jus de fruits ou de légumes.
- ✓ Sirop de fruits.
- ✓ Sodas et limonades.

## 2. Boissons non alcoolisées

Les germes présents dans les jus de fruits et les autres boissons hygiéniques non alcoolisées proviennent en grande partie de la matière première.

Le nombre de microorganismes dans les jus fraîchement pressés est souvent très élevé ; il dépend de l'état des fruits (maturation, propreté) et du type d'extraction. On trouve des levures, des spores de moisissures et des bactéries (*Archromobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Erwinia*, *Xanthomonas*, etc..).

D'autres contaminations sont apportées par le sucre et les sirops sucrés (levures osmophiles, moisissures, *Leuconostoc*),

par le matériel utilisé pour la fabrication (levures, moisissures) et par les manipulations (*Micrococcus* et germe des contaminations fécales).

De nombreuses variétés de germes peuvent donc contaminer les boissons non alcoolisées.

La flore banale acidophile et osmophile peut entraîner un certain nombre d'altérations malgré les traitements de stabilisation.

Une fermentation alcoolique peut être provoquée par des levures qui appartiennent le plus souvent au genre *Saccharomyces* (*S. cerevisiae* ; *S. carisbergensis* ou *uvarum*, *S. acidifaciens*, etc), parfois à d'autres genres (*Torulopsis*, *Brettanomyces*, *Candida*) : on distingue souvent les levures à fermentation rapide (essentiellement les *Saccharomyces*) et celles à fermentation lente (les autres).

Dans les sirops concentrés, la fermentation est le fait de levures osmophiles, *Zygosaccharomyces baillii* variété *osmophilus* et *Zygosaccharomyces rouxii*.

L'altération se manifeste par un goût alcoolisé et surtout par un intense dégagement gazeux qui rend la boisson pétillante et qui peut faire gonfler ou éclater les emballages.

Les bactéries lactiques hétérofermentaires (*Lactobacillus pastorianus*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*) et homofermentaires (*Lactobacillus arabinosus*, *Lactobacillus leichmanii*, *Microbacterium*) peuvent fermenter les sucres et entraîner l'apparition des goûts, d'odeurs anormales et le cas échéant de gaz.

Des Clostridium butyriques peuvent se développer dans les jus de tomates dont le pH n'est pas très élevé (pH 4,2). Ils provoquent la formation d'une grande quantité de gaz.

Les *Acetobacter* peuvent entraîner un goût de « sûr » par fermentation acétique de même que les *Gluconobacter*.

### **3. Techniques de prélèvement**

Il n'existe pas de méthodes particulières. Pour les produits embouteillés, les schémas classiques d'échantillonnage sont applicables. Outre les flacons, bouteilles ou bidons anormaux qui sont prélevés à part, des contrôles systématiques sont réalisés par des sondages basés sur des données statistiques ; dans ce cas, un minimum de 5 (ou 10) échantillons est nécessaire.

#### **3.1. Essais de stabilité**

Dans le cas de produits conditionnés, l'essai de stabilité peut être réalisé sur un emballage tel qu'il est livré à la vente : il consiste en une incubation à 30°C pendant au moins 15 jours.

Cet essai de stabilité peut également s'effectuer sur une partie aliquote de l'échantillon (100 ml) que l'on transvase aseptiquement dans un erlenmeyer stérile. Il est dans ce cas possible d'effectuer une incubation avec agitation, ce qui peut favoriser la détection des contaminants dangereux. Dans le cas de jus concentrés, il est intéressant de procéder aussi à un essai de stabilité sur le jus reconstitué par dilution.

#### **3.2. Examen microscopique**

L'étude directe n'est pas possible lors des examens de routine en raison du très faible nombre de germes généralement présents. Dans le cas de fortes altérations, il peut permettre l'orientation des recherches ; il est intéressant d'examiner les dépôts formés.

### **3.3. Analyse des jus de fruits (et légumes), limonades, sodas etc..**

Elle ne s'applique qu'à la recherche et au dénombrement de germes non pathogènes, contrairement à ce qui était envisagé pour les aliments précédents.

#### **3.3.1. Préparation de l'échantillon**

Dans le cas des boissons gazeuses, l'analyse s'effectue après dégazage. Environ 50 ml de produit sont versés stérilement dans un erlenmeyer de 100 ml bouché coton et contenant quelques bille de verre. Le gaz dissous est éliminé par quelques minutes d'agitation à température ambiante.

Un échantillon de 50 ml de produit est prélevé aseptiquement et sert à déterminer la quantité d'agent neutralisant nécessaire.

La détermination s'effectue au pH-mètre à l'aide de phosphate tripotassique à 20%. On note la quantité nécessaire pour obtenir un pH égal à 7, il suffit ensuite d'ajouter à l'échantillon destiné à l'analyse la quantité nécessaire de phosphate tripotassique stérile.

#### **3.3.2. Dénombrement des constituants de la flore par culture classique en milieu gélosé**

Dans la majorité des contrôles de routine, on étudie seulement la flore « totale » et la flore fongique.

La flore totale (flore aérobie mésophile qui inclue certaines levures et moisissures) est dénombrée sur milieu malt gélosé, sur milieu PCA ou sur milieu TDYM.

La flore fongique (levures et moisissures) est dénombrée sur des milieux classiques milieu PDA (**pomme de terre dextrose agar**) ou malt gélosé acidifiés à pH 3,5, milieu OGA.

Les germes osmophiles sont dénombrés par ensemencement d'un milieu malt gélosé additionné de 20% de glucose. L'ensemencement est réalisé dans la masse et les boîtes sont incubées à 25°C. Selon le pH du milieu, on pourra sélectionner divers types de flore (à pH 3,5, la flore fongique ; à pH 5,4, la flore « totale »).

Les coliformes peuvent être dénombrés en milieu solide sur gélose **DL** ou **VRBL** (ensemencement dans la masse) ou en milieu liquide sur bouillon laurylsulfate puis **BLBVB** avec incubation à 30°C (ou 44°C pour les coliformes thermotolérants).

Les spores mésophiles et thermophiles peuvent être dénombrées après un traitement thermique de sélection. Un échantillon de 10 ml est chauffé pendant 10 minutes à 80°C puis refroidi rapidement. La numération s'effectue à partir du liquide face (0,1 ml) des

milieux DTA ou tryptone-soja contenant 0,2% d'amidon. Selon la température d'incubation, on dénombre les mésophiles (30°C) ou les thermophiles (55°C).

La mise en évidence des bactéries lactiques (milieu MRS à pH 6,5 incubation à 30°C) et des *Leuconostoc* peut être utile pour l'étude des altérations et celles des entérocoques (bouillons de Rothe puis Litsky) et staphylocoques (bouillon de Baird-Parker puis coagulase) pour celle de la qualité hygiénique. Les *Clostridium butyriques* sont parfois recherchés.

### **3.3.3. Méthodes par filtration**

Les méthodes par filtration (comptage des cellules ou des micro-colonies au microscope, comptage classique des colonies avec ou sans marqueur coloré ou fluorescent) sont particulièrement adaptées aux produits à faible concentration microbienne et aux analyses de routine.

La filtration sur membrane est très utile lorsque l'on désire mettre en évidence un petit nombre de germes en présence de conservateurs. Elle permet en effet d'effectuer un véritable « lavage » des cellules recueillies avant culture. Il suffit de faire passer au travers du filtre, après le produit à analyser, un liquide de rinçage stérile, par exemple du milieu tryptone-sel à 0,3% de Tween 80.

### **3.3.4. Autres méthodes**

- ✓ Le dosage de l'ATP par le système luciférase/luciférine (bioluminescence) et la mesure de la modification du potentiel redox (activité réductasique) sont utilisables.
- ✓ Le test de viabilité en cytométrie de flux est également employé pour les levures des jus de fruits.

## **3.4. Analyse des concentrés et extraits de fruits (et légumes)**

La caractéristique principale de ces produits est la forte pression osmotique qui y règne et qui conduit à la sélection d'une flore osmophile.

### **3.4.1. Préparation de l'échantillon**

Selon la nature du produit ou celle des analyses à effectuer, l'échantillon doit être utilisé tel quel ou dilué. La flore osmophile est dénombrée de préférence à partir du produit pur.

Pour les extraits de fruits, le jus de départ est reconstitué à l'aide d'eau distillée. Les dénombrements sur membrane sont ici particulièrement difficiles en raison de la forte viscosité des produits.

Le dénombrement de la flore totale peut être réalisé après neutralisation. Cette neutralisation s'effectue comme décrit plus haut sur une dilution au 1/10<sup>e</sup>.

### **3.4.2. Dénombrement de la flore**

Il s'effectue le plus souvent par culture classique sur milieu gélosé ou si cela est possible sur membrane. Les analyses décrites sont très voisines de celles décrites pour les jus de fruits.

On dénombre pratiquement dans tous les cas :

- ✓ La flore aérobie mésophile « totale » sur 25 ml de dilution 1/10<sup>e</sup> neutralisée lorsque l'on utilise la méthode par filtration ; à partir de 0,1 ml ou 1 ml de produit brut ou de ses dilutions par culture classique (incubation pendant 3 à 7 jours à 30°C) ;
- ✓ La flore fongique sur 100 ml de produit brut par filtration mais avec une membrane à gros pores, ou à partir de 1 ml ou 5 ml de produit brut ou de ses dilutions par culture classique (incubation 3 à 10 jours à 25°C).
- ✓ La flore osmophile « totale ». On utilise des milieux à forte pression osmotique, par exemple les milieux gélosés, levurés, glucosés à 37,5% ( $a_w=0,92$ ) à 50% ( $a_w=0,84$ ) ou à 60% ( $a_w=0,80$ ), dits « honey agar », ou la gélose de Whalley. Le dénombrement s'effectue à partir de 1 à 5 ml de produit brut ou à partir de dilutions.
- ✓ Les spores mésophiles et exceptionnellement les coliformes, les entérocoques et les staphylocoques.
- ✓ Les méthodes de cytométrie de flux et le dosage de l'ATP sont utilisables.