

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :  
(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

**2 485 732**

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 80 14147**

(54)

Procédé et appareil pour collecter stérilement et automatiquement des échantillons liquides dans des éprouvettes stériles.

(51)

Classification internationale (Int. Cl.<sup>3</sup>). G 01 N 1/10.

(22)

Date de dépôt..... 25 juin 1980.

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée :

(41)

Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 53 du 31-12-1981.

(71)

Déposant : INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, établissement public,  
résidant en France.

(72)

Invention de : Sauveur Almanza et Raoul Renaud.

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : Cabinet Harlé et Léchopiez,  
21, rue de la Rochefoucauld, 75009 Paris.

La présente invention concerne un procédé et un appareil pour collecter stérilement et automatiquement des échantillons liquides dans des éprouvettes stériles.

5 La plupart des procédés de culture de microorganismes nécessitent des prises d'échantillons régulières au cours du temps afin d'effectuer les analyses, dosages et mesures permettant de suivre l'évolution de cette culture.

10 Les collecteurs d'échantillons liquides qui existent actuellement ne permettent pas une stabilisation satisfaisante de l'échantillon prélevé, la composition de celui-ci évoluant au cours du temps et nécessitant de ce fait une analyse rapide.

Dans l'art antérieur, afin de tenter de stabiliser l'échantillon prélevé, on a proposé d'introduire des additifs  
15 chimiques dans l'échantillon. Toutefois, une telle tentative ne s'est pas révélée satisfaisante car il en résulte trois inconvénients majeurs, à savoir :

- la dilution apportée par l'additif;
- l'interférence possible de l'additif avec une méthode de dosage ultérieure;
- 20 - l'inertie de l'inactivation du microorganisme par cet additif.

Pour remédier à ces problèmes, la demanderesse a mis au point un procédé et un appareil qui permettent d'obtenir des  
25 échantillons rigoureusement représentatifs de l'état de la culture à l'instant effectif de prélèvement.

Le moyen essentiel de la présente invention consiste à mettre en oeuvre une opération de filtration évitant l'adjonction d'additifs chimiques.

30 Grâce à une telle filtration, il est possible d'effectuer une séparation rapide du microorganisme cultivé et de son milieu de culture.

Cette filtration assure la stabilité biologique et biochimique du prélèvement, ce qui permet soit son analyse  
35 immédiate soit sa conservation en vue d'une analyse ultérieure.

L'appareil pour collecter stérilement et automatiquement des échantillons liquides dans des éprouvettes stériles selon la présente invention comprend un support mobile du type barillet sur lequel repose une pluralité d'éprouvettes  
5 destinées à recevoir individuellement selon un cycle déterminé des prélèvements provenant d'une chambre stérilisable externe audit appareil, ledit support mobile étant actionné par l'intermédiaire d'un système de rotation, un ensemble de volets supportés par un axe agissant suivant un mode ouvertu-  
10 re-fermeture en opposition, un dispositif d'acheminement des éprouvettes en deux parties dont l'une est disposée sur un chariot coulissant qui, lors de son déplacement, amène l'éprouvette en vis-à-vis d'une aiguille d'injection animée d'un mouvement ascendant-descendant et reliée à la chambre stéri-  
15 lisable par un flexible au moyen duquel le prélèvement contenu dans ladite chambre est introduit dans l'éprouvette pour subir une filtration, ladite aiguille, avant la mise en place de l'éprouvette en vue de l'injection du prélèvement, se trouvant dans une chambre de stérilisation, et un magasin de ré-  
20 cupération des éprouvettes.

L'appareil selon la présente invention est également remarquable par les caractéristiques ci-après prises isolément ou en combinaison :

- le système de rotation du support mobile est constitué par une roue crantée, un axe tournant et un bras de rotation pourvu d'un cliquet,
- le dispositif d'acheminement des éprouvettes présente la forme d'une cheminée constituée d'une partie fixe et d'une partie mobile,
- 30 - il comprend en outre un programmeur à cames actionné par un moteur électrique ainsi qu'une horloge séquentielle,
- chaque éprouvette est en deux parties séparées entre elles par un disque ou pastille portant une membrane  
35 filtrante, l'éprouvette étant obturée à chacune de ses extrémités par un bouchon plasma

- la membrane est une membrane en fibres de verre de porosité sensiblement de  $0,2 \mu$  et la pastille est une pastille en acier inoxydable fritté.

5 Le procédé pour collecter stérilement et automatiquement des échantillons liquides dans des éprouvettes stériles au moyen de l'appareil selon la présente invention consiste à effectuer une filtration du prélèvement au cours de laquelle du gaz neutre stérile amène ledit prélèvement à traverser une membrane filtrante disposée dans la partie supérieure  
10 de l'éprouvette.

Suivant une caractéristique du procédé de l'invention, le gaz neutre stérile est choisi parmi : Néon, Argon, Krypton, Xénon, Radon, et tout gaz n'altérant pas l'échantillon prélevé.

15 Suivant une autre caractéristique du procédé de l'invention, le volume filtré est fonction du volume de la chambre de prélèvement et de la pression exercée dans l'éprouvette, <sup>et</sup> la pression appliquée varie en fonction de la composition de l'échantillon à filtrer.

20 Divers avantages et caractéristiques de la présente invention ressortiront de la description détaillée ci-après.

L'invention est illustrée, à titre d'exemple non limitatif, aux dessins annexés sur lesquels :

Fig. 1 est une vue en perspective de l'appareil de l'invention.

25 Fig. 2 est un schéma de principe destiné à expliquer la présente invention.

Fig. 3 est une coupe montrant la structure interne d'une éprouvette.

30 Fig. 4 est un schéma de la chambre de prélèvement stérilisable externe à l'appareil à partir de laquelle le prélèvement est acheminé dans l'aiguille d'injection.

L'appareil illustré sur les figures 1 et 2 comprend à sa partie supérieure un support mobile du type barillet 1. Ce barillet 1 peut recevoir plusieurs éprouvettes E; par  
35 exemple, sa capacité peut être de 16 éprouvettes. Le barillet 1 peut tourner au moyen d'un système de rotation consti-

tué d'une roue crantée 2 rendue solidaire du barillet 1 par l'intermédiaire d'un axe tournant 3 et bloqué par un cliquet verrouillant la roue crantée 2 sur un bras de rotation 4.

Grâce aux moyens décrits ci-dessus, une éprouvette E est amenée au-dessus d'un volet supérieur 6 faisant partie d'un ensemble avec un volet intérieur 7 qui est supporté sur un axe 5, ledit ensemble de volets 6,7 fonctionnant selon un mode ouverture-fermeture en opposition. Lors de la rotation de l'axe 5, l'éprouvette E disposée au-dessus du volet supérieur 6 passe dans un dispositif d'acheminement constitué de deux parties, une cheminée fixe 8 et une cheminée mobile 9. Un chariot coulissant 10 supporte la cheminée mobile 9 ainsi qu'une chambre de stérilisation 11 pour une aiguille d'injection 12. Dans le bas de l'appareil est disposé un magasin 13 de récupération des éprouvettes E. L'appareil selon la présente invention comprend également un programmeur à cames 15 actionné par un moteur électrique ainsi qu'une horloge séquentielle, non représentée.

Sur la figure 3, on a illustré la structure interne d'une éprouvette E. Une telle éprouvette E se compose de deux parties désignées respectivement par 16 et 17 qui sont séparées par un disque ou pastille 18 sur lequel repose une membrane filtrante 19. Un joint 20 assure l'étanchéité entre les deux parties 16,17 d'éprouvette E tandis que chaque extrémité est obturée par un bouchon 21.

A titre d'exemple, le disque ou pastille 18 est en acier inoxydable fritté et la membrane 19 est une membrane en fibres de verre "whatman" de porosité  $0,2\mu$  (norme biologique de stérilité). Le bouchon 21 est un bouchon type plasma habituel.

Avant d'expliquer en détail le fonctionnement de l'appareil selon la présente invention, il importe de préciser comment le prélèvement est acheminé dans l'aiguille d'injection. A cet effet, on se reportera à la figure 4.

La figure 4 illustre une chambre de prélèvement stérilisable 14 reliée à la vanne de fond  $V_1$  d'une cuve de ferment-

tation 22. La chambre 14, qui est indépendante de l'appareil de l'invention, est reliée à l'aiguille d'injection 12 par l'intermédiaire d'un flexible F. Le fonctionnement de la chambre 14 sera précisé plus loin et on décrit à présent celui de l'appareil selon la présente invention.

Pour utiliser cet appareil, il est nécessaire de disposer d'une source d'électricité, d'air comprimé, de vapeur, de gaz stérile, et de la chambre de prélèvement stérilisable 14.

Le barillet 1, chargé des éprouvettes E stérilisées au préalable, effectue une rotation partielle au moyen du système de rotation précité constitué par la roue crantée 2, l'axe tournant 3 et le bras à cliquet 4. Il en résulte qu'une éprouvette E est amenée au dessus du volet supérieur 6 obturant la cheminée fixe 8 dans sa partie supérieure. A ce moment, l'axe 5 des volets pivote, ce qui entraîne l'ouverture du volet 6 et la fermeture du volet 7 qui vient obturer la partie inférieure de la cheminée mobile 9. L'éprouvette E tombe ainsi sur le volet 7. Pendant cette phase, l'aiguille d'injection 12 se trouve dans la chambre de stérilisation 11 en circulation vapeur.

La synchronisation des mouvements permet rapidement la sortie de l'aiguille 12 de la chambre de stérilisation 11 par déplacement du chariot 10, la mise en place de l'éprouvette E sous l'aiguille 12 et l'introduction de celle-ci dans l'éprouvette E. Le prélèvement contenu dans la chambre 14 est alors acheminé dans l'éprouvette E par l'intermédiaire de l'aiguille d'injection 12.

Cette opération terminée, l'aiguille 12 sort de l'éprouvette E, le chariot 10 repositionne l'éprouvette E sur le volet 7 et l'aiguille 12 retourne dans la chambre de stérilisation 11. L'axe 5 des volets 6,7 pivote, ce qui entraîne l'ouverture du volet 7 et la fermeture du volet 6; l'éprouvette E tombe alors dans le magasin 13. L'appareil se trouve ainsi en position pour un nouveau cycle.

L'acheminement du prélèvement contenu dans la cuve 22 à

l'aiguille d'injection 12 par l'intermédiaire de la chambre 14 comprend différentes phases : en premier lieu, une phase de stérilisation de la chambre 14 au cours de laquelle les vannes V1, V2 et V5 (voir figure 4) sont fermées, alors que  
5 les vannes V3 et V4 sont ouvertes. Pendant cette phase, de la vapeur VA est introduite; cette vapeur stérilise la chambre 14, l'aiguille 12 et la chambre 11. En second lieu prend place une phase de purge et de refroidissement; la vanne V3 est fermée et la vanne V2 est ouverte qui reçoit du gaz neutre  
10 stérile GN, par exemple de l'azote dont l'effet est de purger les condensats de vapeur. Ensuite, les vannes V2 et V4 sont fermées et la vanne V5 est ouverte et alimentée en fluide réfrigérant FR. La chambre 14 est refroidie par circulation du fluide réfrigérant FR. Simultanément, l'ai-  
15 guille d'injection 12 sort de la chambre de stérilisation 11 pour pénétrer dans l'éprouvette E. On procède alors à la phase de remplissage de la chambre 14. A cet effet, la vanne V5 est fermée et la chambre 14 se trouve à ce moment sous un léger vide. La vanne V1 est alors ouverte et le liquide de  
20 prélèvement P remplit la chambre 14. Dans la phase suivante, la vanne V1 est fermée et les vannes V4 et V2 sont ouvertes. Le gaz neutre stérile GN pousse le prélèvement contenu dans la chambre 14 dans l'éprouvette E par l'intermédiaire du flexible F et de l'aiguille 12. Le fait de réfrigérer la cham-  
25 bre 14 après la stérilisation permet d'obtenir une température et un vide constants dans celle-ci. Cette opération a pour but essentiel d'éliminer l'influence de la pression et de la température dans la chambre sur le volume du prélèvement.

De la façon décrite plus haut, le prélèvement arrive  
30 dans la partie supérieure de l'éprouvette E. La pression du gaz neutre stérile GN appliquée pousse le liquide à travers la membrane filtrante 19 jusqu'à équilibrage de la pression entre les parties inférieure et supérieure 17, 16 de l'éprouvette E, la fonction de la membrane 19 étant de séparer  
35 le substrat liquide et le microorganisme, empêchant ainsi toute évolution de l'échantillon filtré. Le volume filtré dé-

pend du volume de la chambre de prélèvement 14 et de la pression exercée dans l'éprouvette. La pression varie en fonction de la composition de l'échantillon à filtrer. Selon la présente invention, le programmeur à cames 15 commande l'automatisation du fonctionnement de la chambre 14 en liaison avec celle de l'appareil. Les opérations indiquées plus haut s'effectuent à l'aide des vérins pneumatiques actionnés par des minivannes commandées par les cames du programmeur.

L'appareil de l'invention fonctionne toujours sous des conditions stériles et, même pendant le très court instant où l'aiguille 12 se trouve entre la chambre de stérilisation 11 et l'éprouvette E, l'aiguille 12 est à l'intérieur d'un soufflet (non représenté) qui assure l'étanchéité entre le support de l'aiguille 12 et la chambre 11 ou l'éprouvette E. Ce soufflet est stérilisé en même temps que la chambre de stérilisation 11. On notera toutefois que, dans le cas où l'aiguille se trouverait momentanément dans des conditions non stériles, ce fait n'aurait que peu d'importance. En effet, l'essentiel est que l'intérieur du fermenteur ne soit jamais en contact avec l'air extérieur, ce qui est le cas. Les quelques contaminants extérieurs qui pourraient venir souiller l'aiguille 12 seront automatiquement retenus par la membrane filtrante 19 dans la partie supérieure 16 de l'éprouvette E et ne pourront se développer du fait de l'absence du milieu de culture.

La présente invention fournit donc un procédé et un appareil pour collecter stérilement et automatiquement des échantillons liquides dans des éprouvettes stériles. L'invention permet d'effectuer des prélèvements in situ sur des cuves de fermentation industrielles.

L'invention n'est pas limitée au mode de réalisation décrit et englobe ses équivalents techniques.

REVENDICATIONS

1. Appareil pour collecter stérilement et automatiquement des échantillons liquides dans des éprouvettes stériles, caractérisé en ce qu'il comprend un support mobile du type barillet (1) sur lequel repose une pluralité d'éprouvettes (E) destinées à recevoir individuellement selon un cycle déterminé des prélèvements provenant d'une chambre stérilisable (14) externe audit appareil, ledit support mobile (1) étant actionné par l'intermédiaire d'un système de rotation (2,3,4), un ensemble de volets (6,7) supportés sur un axe (5) agissant suivant un mode ouverture-fermeture en opposition, un dispositif d'acheminement (8,9) des éprouvettes (E) en deux parties dont l'une (9) est disposée sur un chariot coulissant (10) qui, lors de son déplacement, amène l'éprouvette (E) en vis-à-vis d'une aiguille d'injection (12) animée d'un mouvement ascendant-descendant et reliée à la chambre stérilisable (14) par un flexible au moyen duquel le prélèvement contenu dans ladite chambre (14) est introduit dans l'éprouvette (E) pour subir une filtration, ladite aiguille (12), avant la mise en place de l'éprouvette (E) en vue de l'injection du prélèvement, se trouvant dans une chambre de stérilisation (11), et un magasin (13) de récupération des éprouvettes (E).

2. Appareil suivant la revendication 1, caractérisé en ce que le système de rotation (2,3,4) du support mobile (1) est constitué par une roue crantée (2), un axe tournant (3) et un bras de rotation (4) pourvu d'un cliquet.

3. Appareil suivant l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le dispositif d'acheminement (8, 9) des éprouvettes (E) présente la forme d'une cheminée constituée d'une partie fixe (8) et d'une partie mobile (9).

4. Appareil suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comprend en outre un programmateur à cames (15) actionné par un moteur électrique, ainsi qu'une horloge séquentielle.

5. Appareil suivant l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que chaque éprouvette (E) est

en deux parties (16,17) séparées entre elles par un disque ou pastille (18) portant une membrane filtrante (19), l'éprouvette (E) étant obturée à chacune de ses extrémités par un bouchon plasma (21).

5           6. Appareil suivant la revendication 5, caractérisé en ce que la membrane (19) est une membrane en fibres de verre de porosité sensiblement de  $0,2\mu$  et la pastille (18) est une pastille en acier inoxydable fritté.

10           7. Procédé pour collecter stérilement et automatique-  
ment des échantillons liquides dans des éprouvettes stériles au moyen de l'appareil selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il consiste à effectuer une filtration du prélèvement (P) au cours de laquelle du gaz neutre stérile (GN) amène ledit prélèvement (P) à tra-  
15 verser une membrane filtrante (19) disposée dans la partie supérieure (16) de l'éprouvette (E).

20           8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce que le gaz neutre stérile (GN) est choisi parmi : Néon, Argon, Krypton, Xénon, Radon, et tout gaz n'altérant pas l'échantillon prélevé.

20           9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que le volume filtré est fonction du volume de la chambre de prélèvement (14) et de la pression exercée dans l'éprouvette (E).

25           10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que la pression appliquée varie en fonction de la composition de l'échantillon à filtrer.

30           11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce qu'il consiste à réaliser une phase de stérilisation de la chambre de prélèvement (14) au cours de laquelle les vannes (V1, V2 et V5) sont fermées alors que les vannes (V3 et V4) sont ouvertes, de la vapeur (V2) étant alors introduite par l'intermédiaire de la vanne (V3), à effectuer une phase de purge et de refroidissement par fermeture de la vanne (V3) et ouverture de la vanne (V2) qui  
35 reçoit du gaz neutre stérile (GN) afin de purger les condensats de vapeur, à arrêter ladite phase de purge par fermetu-

re des vannes (V2 et V4), à refroidir la chambre (14) en faisant circuler du fluide réfrigérant (FR) par ouverture de la vanne (V5), à procéder alors à la phase de remplissage de la chambre (14) après la fermeture de la vanne (V5),  
5 la chambre (14) étant sous un léger vide, par ouverture de la vanne V1, le liquide de prélèvement (P) remplissant ainsi la chambre (14).



