



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

DÉPISTAGE DE LA PRÉSENCE DE BACTÉRIES INDICATRICES ET
PATHOGÈNES DANS L'EAU EN BOUTEILLE (OU DANS DES CONTENANTS SCÉLLÉS)

Don Warburton

Bureau des dangers microbiens, Direction des aliments

Repère postal : 2204A1

Santé Canada, Ottawa (Ontario) K1A 0L2

Courriel : Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. **APPLICATION**

La présente méthode s'applique à la détection de bactéries viables dans l'eau en bouteille (eau dans des contenants scellés, y compris l'eau minérale et l'eau de source) afin de déterminer si elle est conforme aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues et de la section 12 du Règlement.

2. **PRINCIPE**

Cette méthode de dépistage est fondée sur la méthode Warburton (7.1) de détection de micro-organismes viables dans l'eau en bouteille désinfectée (p. ex., par ozonation, micro-filtration, rayons UV ou autre) ou gazéifiée. Après avoir établi la numération des colonies bactériennes aérobies (NCA) ou la présence de micro-organismes dans le bouillon de détection et l'eau peptonée tamponnée, on peut utiliser des géloses sélectives et différentielles pour aider à isoler et identifier des coliformes comme *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres bactéries, en suivant les méthodes décrites dans le Compendium.

3. **DÉFINITIONS**

Voir l'annexe A du volume 3.

4. **PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS**

4.1 Voir l'annexe B du volume 3.

4.2 Chaque unité d'échantillonnage contient au moins 500 mL.

4.3 Garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-4 °C) pendant le transport : tout dépend de la nature du produit.

5. **MATÉRIEL ET PRODUITS SPÉCIAUX**

1) MFQH (1 600 mailles, pores de 0,45 µm) (ISO-GRID^{MD}; disponible chez Oxoid Inc., Ottawa (Ont.)), ou l'équivalent.

2) Pincés à membrane filtrante (Millipore Corp.)

3) Gélose trypticase soya (TSA; disponible dans le commerce)

- 4) Eau peptonée tamponnée (EPT; disponible dans le commerce)
- 5) Bouillon de détection (GP; disponible dans le commerce); préparé à **concentration simple (1X)**.
Note : Les instructions sur la préparation prévoient une triple concentration (3X) pour l'analyse des eaux usées.

NOTE : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Si l'on recommande 35 °C dans la méthode, l'incubateur peut être à une température de 36 +/-1,0 °C. De même, une température moins élevée de 30 ou 25 peut être +/- 1,0 °C. Cependant, lorsque l'on recommande des températures plus élevées, comme 42 ou 45,5 °C, il est essentiel de maintenir les incubateurs ou les bains-marie à +/- 0-5 °C parce que les températures plus élevées peuvent être mortelles pour le micro-organisme que l'on cherche à isoler.

6. MARCHE À SUIVRE

On peut analyser des échantillons individuels ou composés. Suivre les instructions ci-dessous :

6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

6.1.1 Il faut garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-4 °C) au laboratoire, avant l'analyse.

6.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

6.2 Préparation de l'analyse

6.2.1 Il faut avoir préparé des plaques de gélose trypticase soya (TSA) stériles ou des erlenmeyers de 225 mL de bouillon de dépistage à concentration simple (1X) ou d'eau peptonée tamponnée.

6.2.2 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié. **Passer à l'opération 6.3 ou 6.4.**

6.3 Filtration

6.3.1 Étiqueter clairement des boîtes de Petri en double en indiquant les renseignements appropriés.

6.3.2 La MFQH permettra d'établir des dénombrements à partir de suspensions qui contiennent jusqu'à 5 000 organismes/mL. Il ne devrait normalement pas être nécessaire de préparer d'autres dilutions.

6.3.3 Agiter chaque échantillon pour remettre le dépôt en suspension.

6.3.4 Manipuler la MFQH avec des pinces à membrane filtrante stériles.

6.3.5 Suivre les directives du fabricant pour utiliser l'appareil à filtrer et verser 100 mL de l'unité d'analyse dans le filtre. Ouvrir le robinet jusqu'à ce que tout le liquide se soit écoulé et enlever la MFQH de façon aseptique. Répéter l'opération.

6.3.6 Transférer la MFQH sur la surface d'une plaque de TSA en la faisant rouler sur la gélose pour éviter d'emprisonner des bulles d'air. Faire incuber les plaques à l'endroit en piles d'au plus trois, à 35 °C, pendant 18 à 24 h.

6.3.7 Suivre les instructions du fabricant pour nettoyer l'appareil à filtrer.

6.3.8 Si les MFQH ne contiennent pas de micro-organismes, indiquer comme résultat de test <1 CFU/100 mL.

6.3.9 Effectuer la numération et consigner les résultats. Continuer de la façon décrite en 6.5.

6.4 **Ensemencement des bouillons**

- 6.4.1 Transférer de façon aseptique 100 mL de l'unité d'échantillon dans une GP (1X) ou de l'EPT. Incuber les bouillons à 35 °C pendant 18 à 24 h.
- 6.4.2 Après l'incubation, le bouillon de GP sera jaune et contiendra du gaz s'il y a présence de coliformes. D'autres bactéries peuvent modifier légèrement la couleur et produire un peu de gaz. L'EPT sera trouble en présence de bactéries. Certaines bactéries, comme *P. aeruginosa*, peuvent produire une pellicule sur la surface des bouillons.
- 6.4.3 Si les bouillons ne contiennent aucun micro-organisme visible (c.-à-d. aucune turbidité), consigner alors comme résultat <1 CFU/100 mL.
- 6.4.4 Si le bouillon GP est jaune et contient du gaz, il faut alors analyser de nouveau l'unité d'échantillonnage en suivant la méthode officielle pour obtenir une numération quantitative de coliformes. S'il y a d'autres signes visibles de croissance dans l'un ou l'autre des bouillons, on peut alors ensemercer les bouillons sur les géloses sélectives énumérées dans les méthodes MFLP-58B et MFLP-61B.

6.5 **Confirmation**

- 6.5.1 Il faut analyser de nouveau toute unité d'échantillonnage qui contient des bactéries, soit sur la MFQH, soit dans les bouillons, en utilisant les méthodes officielles (MFO) ou les méthodes de laboratoire appropriées (MFLP).

7. **RÉFÉRENCES**

- 7.1 Warburton, D.W. 1999. Methodology for Screening Bottled Water for the Presence of Indicator and Pathogenic Bacteria. Food Microbiol. Sous presse.

8. **PRÉPARATION DES MILIEUX**

Suivre les instructions du fabricant dans le cas des géloses et des bouillons. **Note : Il faut préparer la GP en concentration simple et non en concentration triple de la façon indiquée sur l'étiquette de la bouteille.**