

**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS****OTTAWA****NUMÉRATION DES COLONIES AÉROBIES
DANS LES ALIMENTS ET LES ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX
PAR LA MÉTHODE DE LA MEMBRANE FILTRANTE QUADRILLÉE HYDROPHOBE (MFQH)****Patti Wilson****Laboratoire des aliments
Agence canadienne de l'inspection des aliments
Boîte postale 1060,
1992 Agency Drive
Dartmouth, N.É.
B2Y 3Z7****E-mail: Wilsonpa@inspection.gc.ca****Donna Douey****Contaminants microbiens
Laboratoire de Calgary, ACIA
3650 36th St. N.W.
Calgary, AB
T2L 2L1****E-mail: doueyd@inspection.gc.ca****Lorna Parrington
Bureau des dangers microbiens
Direction générale des produits de santé et des aliments
Repère postal : 2204A2
Ottawa, ON K1A 0L2****1. APPLICATION**

Cette méthode peut être utilisée pour la numération de colonies aérobies (NCA) dans les aliments et les échantillons environnementaux conformément aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette version révisée remplace la méthode MPLP-56 datée de septembre 1998.

2. DESCRIPTION

Il a été démontré que cette méthode produit des résultats satisfaisants pour les viandes et la volaille, les fruits de mer, les produits laitiers et les légumes (11.1) ainsi que pour les échantillons environnementaux (D. Douey, ACIA, Calgary; données non publiées).

3. PRINCIPE

L'analyse par MFQH prend de 24 à 48 heures et donne des résultats plus élevés que ceux obtenus par la méthode de dénombrement en boîte de l'AOAC pour 4 catégories de produits, et des résultats équivalents pour les autres produits (11.1). Une seule dilution suffit pour une plage étendue de niveaux de

contamination. La précision de la numération peut être meilleure que celle des boîtes ou des membranes filtrantes classiques car la MFQH diminue l'effet de l'acuité visuelle des individus sur le dénombrement (11.2). Lorsqu'on s'attend à une faible numération, on peut abaisser la limite de détection en filtrant un plus gros volume de la suspension.

La méthode MFQH décrite ici donne le choix entre deux géloses, la gélose trypticase soja où la culture est colorée avec une solution de chlorure de triphényltétrazolium après 24-48 heures d'incubation (11.1) (ou avec une gélose TSA contenant du TTC) et la gélose TSA additionnée de colorant vert rapide FCF. Dans ce dernier cas, le colorant est utilisé à une concentration qui ne produit aucun signe de toxicité (11.4). Les colonies prennent une couleur verte d'intensité variable.

4. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du Volume 3 (11.3).

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du Volume 3 (11.3).

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux suivants (3,4 et 6) sont disponibles sur le marché et ils doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 et la référence 11.3 pour la formulation de chaque milieu.

NOTE: Si l'analyste utilise des variantes des milieux dont la liste figure dans la présente méthode (soit un produit disponible sur le marché ou fabriqué à partir d'ingrédients), il incombe à l'analyste ou au superviseur du laboratoire d'en assurer l'équivalence.

- 1) MFQH (1600 mailles, pores de 0,45 µm) ou l'équivalent. (Disponible sous le nom ISO-GRID chez Oxoid, Ottawa ou chez Neogen, Lansing MI)
- 2) Pinces pour membrane filtrante (Millipore Corp.)
- 3) Eau peptonée, 0,1 % (PEP) ou diluant peptone/Tween 80 (PT)
- 4) Boîtes de gélose trypticase soja (TSA) (ou TSA contenant du TTC)
- 5) Solution de chlorure de triphényltétrazolium (TTC)
- 6) Boîtes de gélose trypticase soja avec vert rapide (TSFA)
- 7) Solutions enzymatiques (Annexe E du Volume 3; 11.3) nécessaires dans le cas de certains produits alimentaires.
- 8) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent.
- 9) Appareil de filtration avec entonnoir plus préfiltres pour pipettes (Filtaflex, Almonte, Ontario) ou unité de filtration ISO-GRID (Oxoid)
- 10) Interpréteur MFQH (Filtaflex) (facultatif)
- 11) Incubateur capable de maintenir une température de 35°C
- 12) Les compteurs MFQH (linecounter) se sont pas disponibles dans le commerce

7. MARCHE À SUIVRE

Analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement. Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes:

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder les unités d'échantillonnage réfrigérées (0-5°C) ou congelées selon la nature du produit, à l'exception des aliments stables à la température de la pièce. Faire décongeler les échantillons congelés au réfrigérateur ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des microorganismes.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Avoir à portée de la main de l'eau peptonée stérile (PEP) ou du diluant stérile peptone/Tween 80 (diluant PT), de la gélose trypticase soja (TSA), de la gélose TSA avec TTC ou de la gélose trypticase soja avec vert rapide (TSFA) et au besoin, les solutions enzymatiques nécessaires pour la catégorie de produit alimentaire. Utiliser du diluant PT si l'appareil de filtration est utilisé.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail au moyen d'un désinfectant approprié.
- 7.2.3 Identifier clairement les boîtes de Pétri utilisées en double avec les informations appropriées.

7.3 Préparation des dilutions

- 7.3.1 Afin d'assurer que l'unité d'analyse est vraiment représentative, agiter les liquides ou les substances fluides jusqu'à homogénéité. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, constituer l'unité d'analyse en prélevant des portions à différents endroits dans l'unité d'échantillonnage.
- 7.3.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en ajoutant, dans des conditions aseptiques, 10 g ou ml (l'unité d'analyse) à 90 ml de PEP ou de diluant PT. Si l'appareil de filtration est utilisé pour ensemencer la MFQH, se servir du diluant PT. Il est préférable d'utiliser un stomacher pour mettre les organismes en suspension, car cet appareil réduit au minimum la quantité de débris alimentaires en suspension. Transférer une portion représentative de la dilution de 1:10 pour préparer les dilutions en série nécessaires. Consulter l'annexe E du Volume 3 afin de déterminer si un traitement enzymatique est requis. **Le traitement enzymatique n'est pas nécessaire pour les échantillons filtrés à une dilution de 1:100 ou plus.**
- 7.3.3 Mélanger au stomacher pendant 2 minutes.
- 7.3.4 Si la dilution de 1:10 est mélangée par agitation, agiter la bouteille de dilution 25 fois en effectuant des arcs de 30 cm pendant environ 7 secondes.
- 7.3.5 La filtration par la méthode MFQH élimine les acides ou autres inhibiteurs; il n'est pas nécessaire de vérifier et d'ajuster le pH de la suspension.
- 7.3.6 La MFQH permet d'effectuer des numérations à partir de suspensions renfermant jusqu'à 5 000 organismes/ml. Il n'est habituellement pas nécessaire de préparer d'autres dilutions. Au besoin, préparer des dilutions décimales successives en utilisant une pipette stérile distincte pour chaque transfert. Noter la dilution (C) utilisée pour l'analyse.

Conseil utile: Vous pouvez filtrer et ensemercer les dilutions 10^{-1} , 10^{-3} and 10^{-5} , et couvrir ainsi tous les comptes possibles.

- 7.3.7 Si l'on s'attend à une faible numération, filtrer plus de 1,0 ml de la suspension. Filtrer le volume total disponible d'un seul coup; ne pas essayer de filtrer des parts aliquotes successives de 1 ml. Noter le volume (V) filtré.
- 7.3.8 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant d'effectuer les transferts de façon à distribuer uniformément les microorganismes présents.

7.4 Filtration

- 7.4.1 Agiter chaque sac de stomacher ou bouteille à dilution pour remettre en suspension les matières qui pourraient s'y être déposées.
- 7.4.2 Manipuler la MFQH avec des pinces stériles.
- 7.4.3 Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation de l'appareil de filtration. Pipetter aseptiquement 1,0 ml de la dilution choisie et ensemercer la MFQH. Ouvrir le robinet de l'appareil de filtration, laisser tout le liquide s'écouler et retirer aseptiquement la MFQH. Répéter l'essai en double.
- 7.4.4 Suivre les instructions du fabricant pour nettoyer l'appareil.
- 7.4.5 Répéter au besoin avec les dilutions subséquentes.
- 7.4.6 Poursuivre selon les instructions de la section 8 ou de la section 9.

8. ANALYSE AVEC TSA-TTC

8.1 Inoculation et incubation

- 8.1.1 Transférer la MFQH sur la surface d'une boîte de TSA (ou TSA avec TTC) en la roulant sur la gélose de façon à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les boîtes à l'envers à 35°C pendant 24-48 heures pour tous les aliments à l'exception des produits laitiers qu'il faut incuber pendant 48 heures.

8.2 Coloration (si la gélose TSA sans TTC est utilisée)

- 8.2.1 Utiliser des pinces à membrane pour soulever le coin de la MFQH. Appliquer $1,5 \pm 0,5$ ml de solution TTC à 0,1 % sur la gélose et déposer à nouveau la MFQH de telle façon que toute sa surface inférieure est mouillée.
- 8.2.2 Laisser reposer au moins 15 minutes sur le banc avant de procéder à la numération.

8.3 Numération et établissement de la valeur de la MFQH

- 8.3.1 Les colonies dont la couleur varie du rose au rouge à l'intérieur des mailles de la MFQH sont causées par la présence d'organismes aérobies et il faut les compter.
- 8.3.2 Pour le comptage automatique, utiliser un interpréteur MFQH. Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation.
- 8.3.3 Pour effectuer un comptage manuel, utiliser un « Linecounter ». La méthode MFQH donne des numérations plus précises sur une plage plus étendue qu'avec la méthode en boîtes de Pétri. Si possible, compter uniquement les MFQH contenant de 20 à 1 580

mailles occupées (11.2). Le comptes en dehors de cette plage peuvent être dénombrés mais doivent être rapportés comme compte "estimé".

8.3.3.1 Compter 1 (un) pour chaque maille renfermant une croissance dont la coloration varie du rose au rouge. (NE PAS compter les colonies individuelles lorsqu'une maille contient plus d'une colonie rouge.) Si un examen rapide indique qu'il y a moins de 200 mailles occupées, compter toute la MFQH.

8.3.3.2 Lorsque la densité des colonies est plus élevée (jusqu'à 50 % des mailles occupées), tourner la MFQH jusqu'à ce que l'indicateur de centre soit dirigé à gauche ou à droite. Compter les mailles positives dans les 4 rangées situées immédiatement sous le centre et dans les 4 rangées situées immédiatement au-dessus du centre (8 rangées). Multiplier ce compte partiel de la MFQH par 5 pour estimer la valeur de la MFQH.

8.3.3.3 Lorsque la MFQH est tellement pleine qu'il semble plus facile de compter les mailles négatives, procéder comme en (8.3.3.1) et (8.3.3.2). Soustraire le compte négatif de la MFQH de 1 600 ou 320, selon qu'on a compté toute la MFQH ou seulement le cinquième de celle-ci. Multiplier par 5 pour obtenir la valeur de MFQH si l'on n'a compté que le cinquième de la MFQH.

8.3.3.4 Lorsque toutes les mailles de la MFQH sont remplies de colonies dont la couleur varie du rose au rouge, noter que les colonies sont trop nombreuses pour être comptées (TNTC).

8.3.4 Noter les valeurs de la MFQH des essais effectués en double. Si aucune maille ne contient de coloration variant du rose au rouge, noter que la valeur de la MFQH est de zéro.

8.4 Calcul du nombre le plus probable d'organismes aérobies

Voir l'annexe C du Volume 3 (11.3).

9. ANALYSE AVEC TSFA

9.1 Inoculation et incubation

9.1.1 Transférer la MFQH sur la surface d'une boîte de TSFA en la roulant sur la gélose de façon à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les boîtes à l'envers à 35°C pendant 48 heures.

9.2 Numération et établissement de la valeur de la MFQH

9.2.1 Les colonies vertes à l'intérieur des mailles de la MFQH sont causées par la présence d'organismes aérobies et il faut les compter.

9.2.2 Pour le comptage automatique, utiliser un interpréteur MFQH. Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation.

9.2.3 Pour effectuer un comptage manuel, utiliser un « Linecounter ». La méthode MFQH donne des numérations plus précises sur une plage plus étendue qu'avec la méthode de boîtes de Pétri. Si possible, compter uniquement les MFQH contenant de 20 à 1 580 mailles occupées (11.2). Les comptes en dehors de cette plage peuvent être comptés mais doivent être rapportés comme compte "estimé".

- 9.2.3.1 Compter 1 (un) pour chaque maille contenant une croissance de coloration verte. (NE PAS compter les colonies individuelles lorsqu'une maille contient plus d'une colonie verte). Si un estimé rapide indique qu'il y a moins de 200 mailles occupées, compter toute la MFQH.
- 9.2.3.2 Lorsque la densité des colonies est plus élevée (jusqu'à 50 % des mailles occupées), tourner la MFQH jusqu'à ce que l'indicateur de centre soit dirigé à gauche ou à droite. Compter les mailles positives dans les 4 rangées situées immédiatement sous le centre et dans les 4 rangées situées immédiatement au-dessus du centre (8 rangées). Multiplier ce compte partiel de la MFQH par 5 pour estimer la valeur de la MFQH.
- 9.2.3.3 Lorsque la MFQH est tellement pleine qu'il semble plus facile de compter les mailles négatives, procéder comme en (9.2.3.1) et (9.2.3.2). Soustraire le compte négatif de la MFQH de 1 600 ou 320, selon qu'on a compté toute la MFQH ou seulement le cinquième de celle-ci. Multiplier par 5 pour obtenir la valeur de MFQH si l'on n'a compté que le cinquième de la MFQH.
- 9.2.3.4 Lorsque toutes les mailles de la MFQH sont remplies de colonies vertes, noter que les colonies sont trop nombreuses pour être comptées (TNTC).
- 9.2.4 Noter les valeurs de la MFQH des essais effectués en double. Si aucune maille ne contient de coloration verte, noter que la valeur de la MFQH est de zéro.

9.3 Calcul du nombre le plus probable d'organismes aérobies

Voir l'annexe C du Volume 3 (11.3).

10. RAPPORT DES RÉSULTATS

- 10.1 Noter le NPPUC moyen calculé aux paragraphes 8.4 et 9.3 en arrondissant à deux chiffres significatifs (p. ex., noter $2,9 \times 10^3$ pour 2 850).
- 10.2 Lorsque la dilution la plus faible ne produit aucune maille positive dans la MFQH, la valeur à noter est la plus faible moyenne que l'on peut obtenir lorsqu'un volume donné estensemencé sur une série donnée de MFQH en double. La moyenne est précédée du signe « moins de » (<). P. ex., pour 1,0 ml et un ensemble de MFQH en double (1 ml par MFQH), la valeur est <0,5. Il faut multiplier ce chiffre par le facteur de dilution de l'inoculum sur la MFQH.

11. RÉFÉRENCES

- 11.1 Parrington, L.J., A.N. Sharpe et P.I. Peterkin, 1993, Improved aerobic colony count technique for hydrophobic grid membrane filters, Appl. Environ. Microbiol. 59:2784-2789.
- 11.2 Sharpe, A.N. et P.I. Peterkin, 1988, Membrane Filter Food Microbiology, Research Studies Press Ltd., Taunton, Somerset, U.K.
- 11.3 Annexes A, B, C, E et G, Vol. 3, Compendium de méthodes.
- 11.4 Entis, P. and P. Boleszczuk. 1986. Use of Fast Green FCF with tryptic soy agar for aerobic plate count by the hydrophobic grid membrane filter. J. Food Prot. 49:278-279.
- 11.5 Entis, P. 1986. Hydrophobic Grid Membrane Filter Method for Aerobic Plate Count in Foods. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 69:671-676.

12. PRÉPARATION DES MILIEUX

12.1 Lorsqu'on utilise la stérilisation à la vapeur, il est essentiel d'attendre assez longtemps pour laisser la charge parvenir à la température requise avant que la période de stérilisation proprement dite commence. Cette période d'attente varie selon la nature et la grosseur de la charge. Il faut donc prévoir des temps d'exposition suffisants pour assurer que la stérilisation des solutions en contenants et des milieux de culture stables à la chaleur est complète. Consulter le mode d'emploi du stérilisateur.

12.2 Gélose trypticase soja contenant du TTC (0,01%)

| | |
|---|---------|
| Gélose trypticase soja (BBL) ou gélose tryptic soja (Difco) | 40,0 g |
| Eau distillée | 990 ml |
| Solution mère de TTC 1% | 10,0 ml |

Suspendre le milieu déshydraté dans l'eau distillée. Stériliser à 121°C pendant 15 minutes. Refroidir à 47°C. Ajouter aseptiquement 10,0 ml de la solution de TTC par litre de milieu. Mélanger vigoureusement. Répartir 20 ml dans les boîtes de Pétri.

Note: La solution de TTC est sensible à la chaleur. Refroidir la gélose à 47°C avant d'ajouter la solution. Ne pas utiliser si le milieu devient rose.

12.3 Solution de chlorure de 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) à 1% (pour le milieu ci-dessus (12.2))

Cette solution est utilisée pour préparer la solution de travail de TTC à 0,1% et pour la gélose trypticase soja (TSA) avec TTC à 0,01%.

| | |
|--|----------|
| Chlorure de 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) | 1,00 g |
| Eau distillée | 100,0 ml |

Dissoudre le TTC dans l'eau purifiée. Stériliser par filtration. Répartir 10,0 ml dans des tubes Sarstedt pour ajout au milieu TSA, ou en vrac dans un flacon, pour préparer la solution TTC à 0,1%. Entreposer les aliquots de 10,0 ml à -20°C et les flacons à 4°C.

Solution de travail de TTC 0,1%

Pour préparer la solution de travail de TTC 0,1%, ajouter 90,0 ml d'eau purifiée et 10,0 ml de la solution TTC à 1% dans un flacon de 250 ml. Mélanger délicatement. Entreposer à 22°C jusqu'à 1 mois.