



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

NUMÉRATION DES COLONIES AÉROBIES DANS LES ALIMENTS

Division de l'évaluation microbiologique
Bureau des dangers microbiens, DGPSA
Repère postal 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2

1. APPLICATION

Cette méthode est applicable à la numération des bactéries aérobies viables (bactéries psychrophiles, mésophiles et/ou thermophiles) dans les aliments afin d'établir s'il y a conformité avec les exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Lorsqu'une méthode officielle est prescrite pour un aliment, il faut suivre cette méthode. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-18 datée d'avril 1998.

2. PRINCIPE

La numération des colonies aérobies (NCA) sert à déterminer le nombre estimé de bactéries aérobies viables par g ou ml de produit. Une portion du produit est mélangé avec un milieu gélosé spécifique et est incubé à une température et pendant une période déterminées. On suppose que chaque bactérie aérobie viable se multipliera dans ces conditions déterminées d'incubation et produira une colonie visible dénombrable.

3. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 2.

Bactérie psychrophile: micro-organisme dont la température optimale de croissance est égale ou inférieure à 15°C, dont la limite supérieure pour la croissance est de 20°C, et dont la limite inférieure de croissance est égale ou inférieure à 0°C.

Bactérie mésophile: micro-organisme dont la température optimale de croissance se situe dans la plage généralement acceptée de 20 - 45°C.

Bactérie thermophile: micro-organisme dont la température optimale de croissance est > 45°C. Voir la méthode MFHPB-01

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 2.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux et réactifs suivants (1 à 4) sont disponibles commercialement et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir également l'annexe G du volume 2 pour la formulation des milieux individuels.

- 1) Gélose pour dénombrement en plaque (Plate Count Agar - PCA)
- 2) Diluant à l'eau peptonée (0,1 %)
- 3) Citrate de sodium aqueux 2,0 %, tempéré à 45 °C (pour les échantillons de fromage seulement)
- 4) Chlorure de 2,3,5,triphenyltetrazolium (0,1%) (facultatif)
- 5) NaOH 1N et HCl 1N
- 6) pH mètre ou papier pH capable de distinguer de 0,3 à 0,5 unité pH dans l'échelle de pH 5,0 à 8,0
- 7) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 8) Incubateur capable de maintenir la température de croissance requise pour le type spécifique de bactéries aérobies dénombrées (pour les bactéries psychrophiles: 15 - 20°C, pour les bactéries mésophiles: 30 - 35°C, et pour les bactéries thermophiles: 55°C) et bain d'eau à 45°C.

NOTE : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie soient maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 35 +/-1,0 °C. De même, des températures plus basses de 30° ou 25° peuvent être à +/-1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à +/-0,5 °C de variation. Une température plus élevée peut être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

- 9) Compteur de colonie (facultatif)

6. MARCHE À SUIVRE

Déterminer le type de bactéries aérobies qui doit être dénombré. Analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement. L'épreuve doit être effectuée conformément aux instructions suivantes:

6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 6.1.1 Pendant l'entreposage et le transport, à l'exception des aliments stables à la température de la pièce, garder les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0-5°C). Il faut garder au congélateur les unités d'échantillonnage de produits congelés.
- 6.1.2 Faire dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.
- 6.1.3 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur arrivée au laboratoire.

6.2 Préparation des milieux de culture

- 6.2.1 Préparer la gélose pour dénombrement en plaque (PCA) et la répartir en quantités appropriées. Stériliser.
- 6.2.2 Refroidir la gélose fondue dans un bain-marie à 45°C en veillant à ce que le niveau d'eau dépasse de 1 cm le niveau du milieu dans les bouteilles.

- 6.2.3 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié.
- 6.2.4 Marquer clairement les boîtes de Pétri préparées en double.

6.3 Préparation des dilutions

- 6.3.1 Préparer le diluant stérile à l'eau peptonée 0.1 %.
- 6.3.2 Pour obtenir une unité d'analyse vraiment représentative de l'unité d'échantillonnage, agiter les liquides et les matières fluides jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas d'un solide, obtenir l'unité d'analyse en prélevant une portion à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.
- 6.3.3 Préparer une dilution à 1:10 de l'aliment en mélangeant de façon aseptique 25 g ou ml (l'unité analytique) avec 225 ml du diluant requis, tel qu'indiqué au tableau 1. Si la taille de l'échantillon diffère de 25 g ou ml, il faut maintenir à 1:10 le ratio échantillon : diluant tel que 11(10) g ou ml dans 99 (90) ml.

NOTE : Le volume entre parenthèses indique une autre façon de préparer les dilutions.

- 6.3.4 Si l'on utilise un mélangeur pour obtenir une suspension homogène, ne pas mélanger pendant plus de 2,5 min. afin d'éviter de surchauffer. Dans le cas des aliments qui ont tendance à mousser, régler le mélangeur à basse vitesse et prélever ensuite une portion aliquote sous l'interface liquide/mousse. Pour obtenir une suspension homogène par agitation, agiter les bouteilles de dilution 25 fois en suivant un arc de 30 cm pendant environ 7 sec.
- 6.3.5 Dans certains cas, il peut être souhaitable de préparer la dilution initiale en pourcentage pour obtenir un poids de la matière à analyser plus précis que celui obtenu en utilisant la méthode habituelle de dilution établie selon un ratio. Par exemple, une solution à 10% (suspension) contient 10 g (ml) par 100 g (ml) de solution (suspension), tandis qu'une dilution à 1:10 contient 10 g (ml) de produit (soluté) plus 90 ml de diluant (solvant).
- 6.3.6 Vérifier le pH de l'aliment en suspension. Si le pH se situe en dehors de la plage de 5,5 à 7,6, l'ajuster à 7,0 avec du NaOH ou du HCl stérile.
- 6.3.7 Préparer les dilutions décimales successives requises en utilisant une pipette stérile différente pour chaque transfert.
- 6.3.8 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant les transferts afin d'assurer que les micro-organismes présents sont distribués de façon uniforme.

6.4 Ensemencement

- 6.4.1 Agiter chaque dilution afin de remettre en suspension le matériel qui aurait pu se déposer au fond de la bouteille au cours de la préparation.
- 6.4.2 Utiliser une pipette pour transférer 1 ml ou 0,1 ml des dilutions requises dans chacune des boîtes de Pétri préparées en double et bien marquées.
- 6.4.3 Dans le cas des produits qui ont tendance à adhérer au fond des boîtes, ajouter l'inoculum à 1,0 ml de diluant stérile placé auparavant dans la boîte de Pétri.
- 6.4.4 Verser 12-15 ml de gélose tempérée dans chacune des boîtes et mélanger en tournant et en inclinant les boîtes. Laisser la gélose se solidifier. Il faut verser le milieu dans les boîtes au plus tard 15 minutes après la préparation des dilutions.

6.5 Incubation

Incuber les boîtes de gélose à l'envers pendant $48h \pm 2 h$. La température d'incubation est dépendante des exigences de la température de croissance des micro-organismes ciblés (pour les bactéries psychrophiles: 15 - 20°C, pour les bactéries mésophiles: 30 - 35°C, et pour les bactéries thermophiles: 55°C) . Les géloses utilisées pour la numération des bactéries psychrophiles et thermophiles peuvent être incubées jusqu'à 5 jours. D'autres combinaisons de temps et de température peuvent être utilisées si le laboratoire a vérifié leur convenance. Éviter d'empiler ou d'entasser trop de boîtes afin d'atteindre rapidement et uniformément la température désirée.

6.6 Numération des colonies

- 6.6.1 Dénombrer rapidement les colonies après la période d'incubation.
- 6.6.2 Si possible, sélectionner les boîtes de gélose qui contiennent de 20 à 200 colonies (y compris les colonies en tête d'épingle). Si les dénombrements ne sont pas à l'intérieur de cette plage, sélectionner les boîtes dont le dénombrement se rapproche le plus de la plage 20 - 200.
- 6.6.3 Si des boîtes présentent une croissance confluyente (envahisseurs), choisir une zone représentative des boîtes sans croissance confluyente et compter les colonies contenues dans cette zone. Pour calculer la numération totale d'une boîte, multiplier le dénombrement de la zone représentative par la réciproque de la fraction de la boîte dénombrée : par exemple, 30 colonies dénombrées sur 1/4 de la surface de la boîte donnent un dénombrement total de : $30 \times 4 = 120$ colonies.

6.7 Différenciation des colonies et des particules interférentes

- 6.7.1 Les particules d'aliments comme la viande, la poudre de lait, etc., nuisent souvent à la numération des boîtes. On peut régler le problème en préparant une boîte supplémentaire pour chaque dilution et en la réfrigérant comme témoin négatif pour la numération.
- 6.7.2 On peut également, après la période d'incubation, étaler uniformément 2 ml de chlorure de 2,3,5, triphényltétrazolium à 0,1% sur la surface de la gélose. Faire tourner doucement les boîtes d'un côté à l'autre pour recouvrir toute la surface avec la solution. Verser l'excès de solution et laisser les boîtes reposer à l'envers à la température ambiante pendant 3 heures. Les bactéries transforment l'indicateur en formazan colorant ainsi les colonies en rouge et permettant de les distinguer des particules d'aliments. À noter que les colonies ne peuvent plus être prélevées pour isolement après ce traitement.

6.8 Inscription des résultats

- 6.8.1 Calculer le dénombrement moyen (moyenne arithmétique) des boîtes en double en suivant les exemples du Chapitre 6 dans « Standard Methods for the Examination of Dairy Products », A.P.H.A., 16^e édition (7.2).
- 6.8.2 Pour rapporter les résultats (Tableau II), arrondir les dénombrements à deux chiffres significatifs et inscrire seulement les deux premiers chiffres de gauche (par exemple: pour 2 850, inscrire 2 900).
- 6.8.3 Si la dilution la plus faible ne présente pas de colonies, la valeur inscrite sera la plus faible moyenne que l'on peut obtenir d'un volume donné versé dans un ensemble de boîtes préparées en double, précédée du signe « moins de » (<). Par exemple, pour un ensemble de boîtes préparées en double etensemencées avec 1 ml/boîte de Pétri, la valeur est de < 0,5. La plus faible moyenne possible pour une colonie sur l'une des deux boîtes préparées en double est de:

$$\frac{1 + 0}{2} = 0,5.$$

Cette valeur s'applique à une dilution de 10^0 , i.e. pour un facteur de dilution égal à 1. Pour les

autres dilutions, multiplier la valeur numérique de 0,5 par la réciproque de la dilution; c'est-à-dire le facteur de dilution.

Par exemple, $\frac{1}{10^{-1}} = 10$.

- 6.8.4 Pour calculer la numération des colonies aérobies (NCA), utiliser la formule: $N = A \times D$, où N représente le nombre de colonies par g (ml) de produit, A est le dénombrement moyen par boîte et D est le facteur de dilution respectif.

7. RÉFÉRENCES

- 7.1 American Public Health Association (APHA). 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Third edition. C. Vanderzant and D.F. Splittstoesser (eds.). American Public Health Association Inc., Washington, D.C.
- 7.2 American Public Health Association (APHA). 1992. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. Chapter 6. Sixteenth edition, American Public Health Association, Washington, D.C.
- 7.3 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 7.4 Solberg M. and B.E. Proctor, 1960. A technique utilizing 2,3,5, triphenyltetrazolium chloride for recognition of bacterial colonies in the presence of large numbers of food particles. *Food Technology*, **14** (7): 343-346.

TABLEAU I

Catégorie d'aliment	Préparation*	Traitement
<u>Liquides:</u> lait, eau, etc.	à l'aide d'une pipette, transférer directement dans les boîtes de Pétri ou ajouter au diluant à l'eau peptonée	agiter
liquides visqueux	peser dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
<u>Solides:</u> solides hydro-solubles	peser dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
poudres, viandes	peser dans le diluant à l'eau peptonée	passer au mélangeur ou au «stomacher»
fromage	peser dans du citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) à 2% porté au préalable à 45°C	passer au mélangeur ou au «stomacher»
épices	peser dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
mollusques	peser dans le diluant à l'eau peptonée	passer au mélangeur ou au «stomacher»

* Avant le mélange, l'échantillon peut être pesé dans un sac à «stomacher» ou dans un pot à mélangeur auquel est ajouté le diluant.

TABLEAU II

Exemples pour l'inscription des résultats

Exemples du nombre moyen de colonies	Dilution	Inscrire comme étant le nombre de bactéries par g (ml)
Numérations entre 20-200, par exemple, 144	1:1000	140 000
numérations de plus de 200, par exemple, 440	Dilution la plus élevée 1:1000	440 000 E
numérations de moins de 20, par exemple, 15	Dilution la plus faible 1:1000	15 000 E
aucune numération, 0	Dilution la plus faible 1:1000	< 500