



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS
POUR LA NUMÉRATION DES COLONIES AÉROBIES (NCA)**

1. APPLICATION

Cette méthode sert à déterminer le nombre total de bactéries aérobies (numération des colonies aérobies ou NCA) dans le lait, la crème et autres produits laitiers pasteurisés non-fermentés, les produits laitiers congelés (crème glacée et lait glacé), le beurre, la poudre de lait et autres produits laitiers en poudre et le lait destiné à être utilisé dans la fabrication de produits laitiers afin de déterminer s'il y a conformité aux exigences de l'article B.08.011 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette méthode révisée remplace les méthodes MFO-2 et -7 datées du 30 novembre 1981.

2. DESCRIPTION

2.1 Des dilutions de l'échantillon d'aliment sont ensemencées au moyen de la méthode de milieu coulé en boîtes de Pétri. Les colonies viables sont dénombrées et la conformité est déterminée à partir de ces dénombrements.

2.2 Méthodes équivalentes

La méthode MFHPB-33, considérée équivalente à la méthode de milieu coulé en boîtes de Pétri présentée ici, peut être utilisée pour établir la NCA afin de déterminer s'il y a conformité avec l'article du Règlement de la Loi sur les aliments et drogues cité ci-dessus ainsi qu'au Tableau 1 de la présente méthode. Cette méthode se retrouve dans le Volume 2 du Compendium de méthodes.

3. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 1.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 1.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux suivants (1et 2) sont disponibles dans le commerce et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'Annexe G du Volume 1 ainsi que la référence citée en 7.2 pour la composition de chaque milieu

- 1) Diluant à l'eau peptonée (0,1 %)
- 2) Gélose pour dénombrement en plaque (Plate Count Agar - PCA)
- 3) Thermomètre, étalonné et homologué

- 4) Incubateur, 35 °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 près. 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 près. Des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

- 5) Stomacher, mélangeur ou l'équivalent
- 6) Cultures témoins : utiliser des cultures ATCC ou l'équivalent
- 7) 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
- 8) NaOH 1N et HCl 1N stériles

6. MARCHE À SUIVRE

Chaque unité d'échantillonnage doit être analysée individuellement. Effectuer l'analyse en suivant les instructions ci-dessous :

6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 6.1.1 Garder les unités d'échantillonnage congelées dans un congélateur avant de les analyser. Réfrigérer les produits stables à la température de la pièce (0-5 °C).
- 6.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus rapidement possible après leur arrivée au laboratoire.

6.2 Préparation des dilutions

- 6.2.1 Préparer le diluant à l'eau peptonée à 0,1 % stérile.
- 6.2.2 Combiner des portions prélevées à plusieurs endroits de l'unité d'échantillonnage afin d'obtenir une unité d'analyse représentative de 11 (10) g.

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

- 6.2.3 Préparer une dilution à 1:10 de l'échantillon en ajoutant de façon aseptique l'unité d'analyse à 99 (90) ml du diluant à l'eau peptonée.
- 6.2.4 Mélanger la dilution 1:10 en agitant la bouteille de dilution 25 fois en suivant un arc de 30 cm pendant environ sept secondes.
- 6.2.5 Vérifier le pH de la dilution. Si le pH ne se situe pas entre 5,5 et 7,6, ajuster à 7,0 en ajoutant du NaOH 1N ou du HCL 1N stérile.
- 6.2.6 Préparer les dilutions successives requises pour déterminer la NCA dans l'échantillon en transférant 11 (10) ml de la dilution antérieure dans 99 (90) ml de diluant à l'eau peptonée à 0,1 %. Agiter toutes les dilutions (comme dans l'étape 6.2.4 ci-dessus) immédiatement avant d'effectuer le transfert afin d'assurer que les micro-organismes présents sont distribués de façon uniforme. Utiliser une pipette stérile distincte pour chaque transfert.
- 6.2.7 Effectuer des dilutions semblables en utilisant la culture témoin.

6.3 Détermination de la NCA

Le milieu utilisé est de la gélose PCA préparée pour produire des milieux coulés en boîtes de Pétri.

6.3.1 Analyse : Procéder de la façon suivante pour les dilutions préparées à partir de l'aliment et de la culture témoin :

- a. Agiter chaque bouteille de dilution pour remettre les matières en suspension.
- b. Pipetter sans tarder 1 ml de chaque dilution préparée dans chacune de deux boîtes de Pétri identifiées adéquatement. Utiliser une pipette stérile pour effectuer chaque transfert.
- c. Verser 12-15 ml de gélose tempérée (40-45 °C) dans chaque boîte et mélanger le contenu en tournant et en inclinant.
- d. Laisser solidifier la gélose.
- e. Il faut verser le milieu dans les boîtes de Pétri au plus tard 15 minutes après la préparation des dilutions.
- f. Incuber les boîtes à l'envers à 35 °C pendant 48 ± 2 h. Incuber une boîte non ensemencée comme témoin négatif.
- g. Éviter d'empiler ou d'entasser trop de boîtes de gélose afin de les laisser atteindre rapidement et uniformément la température de l'incubateur.
- h. Dénombrer rapidement les colonies après la période d'incubation.
- i. Pour le dénombrement, sélectionner les boîtes qui contiennent de 20 à 200 colonies, y compris les petites colonies en tête d'épingle. Si les dénombrements ne sont pas à l'intérieur de cette plage, sélectionner les boîtes dont le dénombrement s'en rapproche le plus.

6.3.2 Consignation des résultats

- a. Calculer le nombre moyen (moyenne arithmétique) de colonies sur des boîtes en double en suivant les exemples dans les ouvrages de référence microbiologique, tel que le chapitre 6 de « Standard Methods for the Examination of Dairy Products » (7.1).
- b. Pour rapporter les résultats, il faut arrondir les dénombrements à deux chiffres significatifs et consigner seulement les deux premiers chiffres de gauche (p. ex., pour 2 850, consigner 2 900).
- c. Si la dilution la plus faible ensemencée ne montre aucune colonie, indiquer que le dénombrement est le produit de 0,5 x le facteur de dilution précédé d'un signe « moins que » (<).
- d. Pour établir la NCA, utiliser la formule : $N = AxD$, où N représente le nombre de colonies par g de produit, A est le dénombrement moyen et D, le facteur de dilution respectif.

7. RÉFÉRENCES

- 7.1 American Public Health Association (A.P.H.A.). 1992. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. Chapter 6. 16th Edition (R.T. Marshall, Editor). p. 213-246.

- 7.2 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.

8. INTERPRÉTATION

Les tolérances indiquées ci-dessous et qui représentent le nombre maximal total de bactéries aérobies (numération de colonies aérobies) dans les aliments indiqués au tableau 1 sont appliquées lorsqu'il s'agit de déterminer si le lot analysé du produit est conforme aux articles cités du Règlement sur les aliments et drogues.

TABLEAU I

Tolérance et plans d'échantillonnage pour la NCA dans des aliments spécifiques

Détermination	Aliment	Article de la Loi sur les aliments et drogues	Tolérances			
			Nombre d'unités d'échantillonnage (n)	Nombre acceptable (c)	Concentration de microorganisme (m)	Concentration maximale de microorganisme (M)
NCA	Lait, crème et autres produits laitiers pasteurisés non fermentés	B.08.011	5	2	10 000	25 000
	Produits laitiers congelés (crème glacée et lait glacé), beurre, poudre de lait et autres produits laitiers en poudre	B.08.011	5	2	10 000	50 000
	Lait destiné à être utilisé dans la fabrication de produits laitiers	B.08.011	5	0	50 000	

- Lot :** Quantité définie ou unité de production qu'il est possible d'identifier par le même code. Lorsqu'il n'y a pas de code d'identification, un lot peut être considéré comme a) la quantité de produit fabriquée essentiellement dans les mêmes conditions, au même établissement et représentant au plus une journée de production ; ou b) la quantité de la même variété de produit provenant du même fabricant qui est disponible lors de l'échantillonnage à un endroit donné.
- n :** Nombre d'unités d'échantillonnage habituellement, mais pas toujours, choisies au hasard à partir d'un lot et examinées afin de répondre aux exigences d'un plan d'acceptation particulier. C'est ce qu'on appelle l'échantillon.
- m :** La valeur numérique de « m » représente des concentrations acceptables du micro-organisme, habituellement par g ou ml. Dans un plan à deux classes, « m » distingue les unités d'échantillonnage de qualité acceptable de celles qui sont de qualité inacceptable; dans un plan à trois classes, « m » sépare les unités d'échantillonnage de qualité acceptable de celles qui sont de qualité marginalement acceptable. Les valeurs « m » indiquées dans le tableau sont fondées sur des niveaux atteignables par des BPF.
- M :** (Pour un plan à trois classes seulement), la valeur numérique de « M » représente des concentrations inacceptables de micro-organismes, habituellement par g ou ml, qui indiquent un danger pour la santé ou traumatisme (potentiel), une détérioration imminente ou un manquement grossier à l'hygiène; « M » distingue les unités d'échantillonnage de qualité marginale de celles qui sont de qualité inacceptable. Une valeur établie pour une unité d'échantillonnage d'un échantillon qui est supérieure à « M » rend le lot en question inacceptable.
- c :** Nombre maximal permis d'unités d'échantillonnage de qualité marginale. « c » est le nombre d'acceptation d'un plan. Lorsque ce nombre est dépassé, le lot devient inacceptable.

La méthode décrite ci-dessus qui comporte 6 pages et porte l'identification MFO-24 et la date de Juillet 2002 est par la présente désignée « méthode officielle » mentionnée à l'article B.08.011 du Règlement sur les aliments et drogues pour l'analyse microbiologique du lait, crème et autres produits laitiers pasteurisés non-fermentés, produits laitiers congelés (crème glacée et lait glacé), beurre, poudres de lait et autres produits laitiers en poudre, et le lait destiné à être utilisé dans la fabrication de produits laitiers.

Le sous-ministre adjoint