



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU MINÉRALE

1. APPLICATION

La présente méthode s'applique à la détermination des bactéries coliformes (coliformes) dans l'eau minérale conformément à l'article B.12.001 (b) des Règlements sur les aliments et drogues.

2. ÉCHANTILLONNAGE

2.1 Définition des termes

2.1.1 Lot: Une quantité finie ou une unité de production qui peut être identifiée par le même code. S'il n'y a pas d'identification par code, un lot peut être considéré comme étant (a) la quantité d'eau minérale produite essentiellement sous des conditions identiques au même établissement et ne représentant pas plus que la production d'une journée; ou (b) la quantité d'eau minérale, fabriquée par un seul et même fabricant; qui est disponible lors de l'échantillonnage à un endroit donné.

2.1.2 Échantillon: Les unités d'échantillonnage (sous-échantillons) prélevées par lot pour analyse.

2.1.3 Unité d'échantillonnage: Il s'agit ordinairement d'un format courant du produit renfermant au moins 100 g ou ml. Une unité d'échantillonnage est souvent désignée sous le nom de sous-échantillon.

2.1.4 Unité d'analyse: La quantité de produit prélevée de l'unité d'échantillonnage pour analyse.

2.2 Prélèvement des échantillons

2.2.1 Prendre un échantillon composé de dix unités d'échantillonnage prélevées au hasard sur chaque lot.

2.2.2 Chaque unité d'échantillonnage doit renfermer au moins 100 ml.

- 2.2.3 Prélever à partir de contenants intacts lorsque possible.
- 2.2.4 Si plus de deux heures s'écoulent entre le prélèvement et l'analyse, expédier et entreposer les unités d'échantillonnage dans des dispositifs réfrigérés (< 5°C). Il ne faut pas congeler les unités d'échantillonnage.

3. MODE OPÉRATOIRE

Chacune des dix unités d'échantillonnage doit être analysée individuellement.

Il faut effectuer les épreuves conformément aux instructions suivantes:

3.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

Ne pas entreposer les unités d'échantillonnage pour plus de 24 h avant l'analyse.

3.2 Préparation des milieux

Il faut utiliser les milieux suivants après les avoir préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant.

3.2.1 Bouillon de lauryl-sulfate-tryptose (LST)

3.2.2 Bouillon lactosé au vert brillant et sels biliaires 2% - BGLB

3.3 Préparation des dilutions

Seules les unités d'échantillonnage non diluées sont requises.

3.4 Épreuve de présomption

3.4.1 Le milieu utilisé est le bouillon LST, réparti en volumes de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules à gaz (éprouvettes de Durham renversées).

3.4.2 Disposer les éprouvettes de bouillon LST en rangées de cinq et les marquer en identifiant l'échantillon, l'unité d'échantillonnage et la dilution à ensemercer.

3.4.3 Ensemercer chacune des cinq éprouvettes renfermant du bouillon LST à teneur double avec 10 ml de l'unité d'échantillonnage non diluée; ensemercer chacune des cinq éprouvettes renfermant du bouillon LST à teneur simple avec 1 ml de l'unité d'échantillonnage non diluée; et ensemercer chacune des cinq éprouvettes renfermant du bouillon LST avec 0,1 ml de chaque unité d'échantillonnage non diluée.

3.4.4 Mélanger délicatement l'inoculum et le milieu par agitation ou par rotation, mais éviter que de l'air ne reste emprisonné dans les ampoules à gaz.

3.4.5 Incuber les éprouvettes ensemençées de bouillon LST à 35°C ± 0,5° pendant 24 ± 2 h. Examiner s'il y a eu production de gaz, inscrire les résultats, et, le même jour, commencer l'épreuve de confirmation pour toutes les éprouvettes positives (contenant du gaz) (voir la section 3.5 ci-dessous).

3.4.6 Incuber les éprouvettes négatives pendant 24 ± 2 h supplémentaires, examiner, inscrire le nombre d'éprouvettes positives, l'ajouter aux résultats obtenus à l'étape 3.4.5, ci-dessus, et commencer l'épreuve de confirmation pour les éprouvettes positives supplémentaires.

- 3.4.7 S'il n'y a pas eu production de gaz dans toutes les éprouvettes après 48 ± 2 h, l'épreuve de présomption est négative.
- 3.4.8 Calculer le "NPP" de coliformes présumés par 100 ml d'eau minérale, en suivant les instructions données dans la partie 5, pour convertir le nombre d'éprouvettes positives en NPP. Inscrive les résultats.
- 3.5 Épreuve de confirmation
- 3.5.1 Le milieu utilisé pour l'épreuve de confirmation est le bouillon BGLB réparti en volume de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules à gaz.
- 3.5.2 Soumettre toutes les éprouvettes contenant du bouillon LST qui sont positives (contenant du gaz) à l'épreuve de confirmation.
- 3.5.3 Mélanger le contenu des éprouvettes de bouillon LST positives par agitation ou par rotation, et ensemercer à l'aide d'un fil bouclé du contenu de chaque éprouvette de bouillon LST positive dans une éprouvette distincte de bouillon BGLB. (Éviter d'entraîner la pellicule).
- 3.5.4 Mélanger délicatement l'inoculum et le milieu par agitation ou par rotation, mais éviter que de l'air ne reste emprisonné dans les ampoules à gaz.
- 3.5.5. Incuber les éprouvettesensemencées de bouillon BGLB à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}$ pendant 24 ± 2 h. Examiner s'il y a eu production de gaz et inscrire les résultats.
- 3.5.6 Incuber les éprouvettes négatives pendant 24 ± 2 h supplémentaires, examiner, inscrire le nombre d'éprouvettes positives supplémentaires et l'ajouter aux résultats obtenus à l'étape 3.5.5, ci-dessus.
- 3.5.7 S'il y a eu production de gaz dans les 48 ± 2 h d'incubation, l'épreuve de confirmation est positive.
- 3.5.8 Calculer le "NPP" de coliformes confirmés par 100 ml d'eau minérale, en suivant les instructions données dans la partie 5, pour convertir le nombre d'éprouvettes positives en valeurs NPP. Inscrive les résultats.

4. INTERPRÉTATION

Les limites tolérées telles que spécifiées ci-après, représentant le taux probable maximal de bactéries coliformes (coliformes) dans l'eau minérale doivent être utilisées pour déterminer si le lot de produit examiné est conforme à l'article B.12.001 (b) des Règlements sur les aliments et drogues.

Les bactéries coliformes (coliformes) seront considérées comme absentes d'un lot lorsqu'au plus une unité, des 10 unités d'échantillonnage prélevées sur un lot, est positive à l'égard des coliformes, et que le NPP pour cette même unité d'échantillonnage n'excède pas 10 par 100 ml d'eau minérale.

Les limites tolérées sont résumées dans le tableau qui suit:

<u>Détermination</u>	<u>n</u>	<u>c</u>	<u>m</u>	<u>M</u>
Coliformes	10	1	0	10

n = Nombre d'unités d'échantillonnage (sous-échantillons) qu'il faut examiner par lot.

c = Nombre maximal d'unités d'échantillonnage (sous-échantillons) par lot qui peuvent avoir une

concentration bactérienne supérieure à la valeur prévue sous "m" sans enfreindre les Règlements.

m = Nombre maximal de bactéries par 100 ml d'eau minérale qui ne présente aucun danger (niveau tolérable de contamination).

M = Nombre maximal de bactéries par 100 ml d'eau minérale qui, s'il est dépassé par une unité d'échantillonnage (sous-échantillon) quelconque rend le lot examiné non conforme aux Règlements.

5. CALCUL DES NOMBRES LES PLUS PROBABLES (NPP)

Le tableau A-1 présente les nombres de coliformes les plus probables par 100 g ou ml de produit à l'essai correspondant au nombre d'éprouvettes positives (contenant du gaz) dans l'épreuve des coliformes. Le tableau A-1 a été adapté à partir d'une table de conversion préparée pour l'analyse de l'eau potable où seulement 10, 1,0 ou 0,1 ml de l'eau examinée sont utilisés comme portions. Il serait également approprié que 10, 1,0 et 0,1 g de nourriture solide constituent les portions dans les éprouvettes. Lorsque des portions différentes du produit à l'essai sont placées dans les éprouvettes, les valeurs du NPP obtenues dans le tableau A-1 doivent alors être corrigées en les multipliant par un nombre approprié selon la quantité réelle de produit à l'essai dans les éprouvettes et selon que l'on veut obtenir les NPP par g (ml) comme on le fait habituellement pour les aliments plutôt que par 100 ml (g) comme dans le tableau. On ne tient pas compte du volume de diluant ajouté aux éprouvettes (et accompagnant l'échantillon) lorsqu'on calcule le NPP.

Exemple:

Les éprouvettesensemencées donnent les résultats suivants:

- (1) 5 éprouvettes et 10 ml d'une dilution à 1:10 du produit à l'essai - toutes les 5 sont positives
- (2) 5 éprouvettes et 1 ml d'une dilution à 1:10 du produit à l'essai - 1 est positive
- (3) 5 éprouvettes et 1 ml d'une dilution à 1:100 du produit à l'essai - aucune positive.

Les quantités d'échantillon dans chacune des 5 éprouvettes des trois séries de dilutions représentent respectivement 1; 0,1 et 0,01 g ou ml de produit à l'essai.

Si l'on se reporte au tableau A-1, une lecture de 5-1-0 donne une valeur de 33 si on utilise 10, 1 et 0,1 g ou ml respectivement. Toutefois, comme seulement 1/10 de ces quantités a été, en fait, utilisé dans l'analyse, la valeur 33 obtenue en consultant le tableau A-1, doit être multipliée par 10, ce qui donne $33 \times 10 = 330$ microorganismes par 100 g ou ml de produit à l'essai. Comme les résultats doivent être exprimés par g ou ml, le NPP doit être divisé par 100. Lorsqu'on se sert de dilutions plus élevées, on suit la même méthode mais on augmente le multiplicateur (facteur de dilution) pour relier la quantité de produit à l'essai réellement présente aux valeurs fondées sur les quantités de 10 g, 1 g, et 0,1 g, qu'indique le tableau A-1.

Facteur de dilution = Inverse de la dilution de l'unité d'analyse.

Pour calculer le NPP, utiliser le facteur de dilution de la série médiane des trois dilutions choisies.

Afin de déterminer quelles dilutions consécutives doivent être utilisées, se reporter aux combinaisons indiquées ci-après: (Voir aussi le tableau A-2)

- 5.1 Si l'on a fait seulement 3 dilutions, utiliser les résultats des 3 dilutions pour calculer le NPP. Exemples a et b.
- 5.2 Si l'on a fait plus de 3 dilutions, utiliser seulement les résultats de 3 dilutions consécutives. Choisir la dilution la plus élevée (dernière dilution, c'est-à-dire la dilution contenant la plus petite quantité de produit) dans laquelle toutes les cinq éprouvettes sont positives et les 2 dilutions supérieures subséquentes. Exemples c et d.
- 5.3 Lorsqu'on a fait plus de 3 dilutions, dont aucune ne donne 5 éprouvettes positives, utiliser les 3

premières dilutions. Exemple e.

- 5.4 Si la dilution supérieure aux trois dilutions devant être choisies est positive, le nombre d'éprouvettes positives doit être ajouté à celui de la dilution voisine la moins élevée. Exemple f.
- 5.5 Si les éprouvettes de tous les ensembles d'une série de dilutions sont positives, choisir les 3 dilutions supérieures de la série et se servir du symbole "plus grand que" (>) pour indiquer que le NPP est plus grand que celui qui a été calculé. Exemple g.

Consulter le tableau A-1 et chercher la valeur correspondant au nombre d'éprouvettes positives obtenues.

$NPP/100 \text{ ml} = \text{nombre de microorganismes (tableau A-1)} \times \text{facteur de dilution de l'ensemble intermédiaire}$

TABLEAU A-1

Nombre le plus probable (NPP)
de bactéries par 100 g (ml) de produit à l'essai
en utilisant 5 éprouvettes
contenant 10, 1 et 0,1 ml ou g de produit à l'essai

Pos* 10;1;0,1	NPP	Pos* 10;1;0,1	NPP	Pos* 10;1;0,1	NPP	Pos* 10;1;0,1	NPP	Pos* 10;1;0,1	NPP	Pos* 10;1;0,1	NPP
000	<1,8	100	2	200	4,5	300	7,8	400	13	500	23
001	1,8	101	4	201	6,8	301	11	401	17	501	31
002	3,6	102	6	202	9,1	302	13	402	21	502	43
003	5,4	103	8	203	12	303	16	403	25	503	58
004	7,2	104	10	204	14	304	20	404	30	504	76
005	9	105	12	205	16	305	23	405	36	505	95
010	1,8	110	4	210	6,8	310	11	410	17	510	33
011	3,6	111	6,1	211	9,2	311	14	411	21	511	46
012	5,5	112	8,1	212	12	312	17	412	26	512	64
013	7,3	113	10	213	14	313	20	413	31	513	84
014	9,1	114	12	214	17	314	23	414	36	514	110
015	11	115	14	215	19	315	27	415	42	515	130
020	3,7	120	6,1	220	9,3	320	14	420	22	520	49
021	5,5	121	8,2	221	12	321	17	421	26	521	70
022	7,4	122	10	222	14	322	20	422	32	522	95
023	9,2	123	12	223	17	323	24	423	38	523	120
024	11	124	15	224	19	324	27	424	44	524	150
025	13	125	17	225	22	325	31	425	50	525	180
030	5,6	130	8,3	230	12	330	17	430	27	530	79
031	7,4	131	10	231	14	331	21	431	33	531	110
032	9,3	132	13	232	17	332	24	432	39	532	140
033	11	133	15	233	20	333	28	433	45	533	180
034	13	134	17	234	22	334	31	434	52	534	210
035	15	135	19	235	25	335	35	435	59	535	250
040	7,5	140	11	240	15	340	21	440	34	540	130
041	9,4	141	13	241	17	341	24	441	40	541	170
042	11	142	15	242	20	342	28	442	47	542	220
043	13	143	17	243	23	343	32	443	54	543	280
044	15	144	19	244	25	344	36	444	62	544	350
045	17	145	22	245	28	345	40	445	69	545	440
050	9,4	150	13	250	17	350	25	450	41	550	240
051	11	151	15	251	20	351	29	451	48	551	350
052	13	152	17	252	23	352	32	452	56	552	540
053	15	153	19	253	26	353	37	453	64	553	920
054	17	154	22	254	29	354	41	454	72	554	1600
055	19	155	24	255	32	355	45	455	81	555	>1600

* Nombre d'éprouvettes positives avec chacun des 3 volumes ou poids utilisés.