



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

**EXAMEN MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU PRÉSENTÉE
DANS DES CONTENANTS HERMÉTIQUES
(À L'EXCLUSION DE L'EAU MINÉRALE ET DE L'EAU DE SOURCE
ET DE LA GLACE PRÉ-EMBALLÉE)**

1. APPLICATION

La présente méthode s'applique à la détermination de la présence de bactéries aérobies (numération des colonies aérobies) et de bactéries coliformes (coliformes) dans l'eau présentée dans des contenants hermétiques à l'exclusion de l'eau minérale et de l'eau de source, et de coliformes dans la glace pré-emballée, conformément aux articles B.12.004 et B.12.005 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 de produit, fabriquée essentiellement sous des conditions identiques au même établissement et ne représentant pas plus que la production d'une journée; ou, (b) la quantité de la même sorte de produit, fabriquée par un seul et même manufacturier, 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 commercialisé dont la quantité ne doit pas être inférieure à 100 ml ou g. 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 ou g.
- 2.2.3 Prélever des contenants intacts lorsque possible.
- 2.2.4 Utiliser des techniques aseptiques pour prélever les unités d'échantillonnage lorsque le produit est en vrac. Déposer chacune des unités d'échantillonnage prélevées dans un contenant stérile distinct.
- 2.2.5 Expédier et entreposer les unités d'échantillonnage d'eau dans des contenants hermétiques sous réfrigération (< 0,5°C) si plus de deux heures s'écoulent entre le prélèvement et l'analyse. Ne pas congeler les unités d'échantillonnage.
- 2.2.6 Ne pas laisser décongeler les unités d'échantillonnage de glace pré-emballée au cours de l'expédition.

3. MODE OPÉRATOIRE

Cinq unités d'échantillonnage doivent être analysées individuellement pour effectuer la numération des colonies aérobies (ACC). Dix unités d'échantillonnage doivent être analysées individuellement pour déceler la présence de coliformes.

Il faut effectuer les épreuves conformément aux instructions suivantes:

3.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

3.1.1 L'eau présentée dans des contenants hermétiques

- (a) Ne pas entreposer les unités d'échantillonnage pendant plus de 24 heures avant l'analyse.

3.1.2 La glace pré-emballée

- (a) Si les unités d'échantillonnage sont pré-emballées dans des contenants étanches, les décongeler dans les contenants, dans un réfrigérateur à 0-5°C, avant l'analyse.
- (b) Si les unités d'échantillonnage ne sont pas dans des contenants étanches, transférer la glace aseptiquement dans des sacs de plastique stériles ou dans d'autres contenants stériles convenables. Fermer hermétiquement les contenants pour éviter toute contamination et décongeler les unités d'échantillonnage dans un réfrigérateur à 0-5°C. Ne pas entreposer les unités d'échantillonnage décongelées pendant plus de six heures 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 Gélose à numération (PC)

3.2.2 Bouillon de lauryl-sulfate-tryptose (LST)

3.2.3 Bouillon lactosé au vert brillant et sels biliaires (2%) - BGLB

3.3 Préparation des dilutions (Uniquement pour l'eau présentée dans des contenants hermétiques)

- 3.3.1 Préparer un diluant stérile à 0,1% d'eau peptonée.
- 3.3.2 Bien mélanger le contenu de chaque unité d'échantillonnage en agitant le contenu.
- 3.3.3 Préparer une dilution de 1:10 de l'eau en transférant aseptiquement à l'aide d'une pipette 11(10)* ml de "l'eau" dans 99(90)* ml de diluant.
- 3.3.4 Mélanger la dilution de 1:10 en agitant la bouteille de dilution 25 fois selon un arc de 30 cm durant environ 7 sec.
- 3.3.5 Préparer les dilutions subséquentes requises pour effectuer l'ACC de l'eau en transférant 11(10) ml de la dilution précédente dans 99(90) ml de diluant.
- 3.3.6 Agiter toutes les dilutions (comme à l'étape 3.3.4, ci-dessus) immédiatement avant les transferts afin d'assurer une distribution uniforme des microorganismes présents.

* Les volumes inscrits entre parenthèses indiquent l'autre quantité possible pour préparer les dilutions.

3.4 Numération des colonies aérobies (ACC)

Examiner cinq unités d'échantillonnage d'eau. Le milieu utilisé est la gélose à numération préparée pour les boîtes de gélose.

3.4.1 Analyse

- (a) Agiter chaque bouteille de dilution pour distribuer uniformément les microorganismes présents.
- (b) À l'aide d'une pipette stérile, transférer sans tarder 1 ml de l'unité d'échantillonnage non diluée dans chacune de deux boîtes de Pétri bien marquées. Répéter le processus pour chaque dilution préparée. (Voir la section 3.3.2 ci-dessus).
- (c) Verser 12-15 ml de gélose refroidie à 40-45°C dans chaque boîte et mélanger le tout par rotation et en inclinant les boîtes.
- (d) Laisser la gélose se solidifier.
- (e) Ne pas verser la gélose dans les boîtes plus de 15 min après la préparation des dilutions.
- (f) Incuber les boîtes de gélose à l'envers à 35°C \pm 0,5 pendant 48 \pm 2 h.
- (g) Éviter l'empilement ou l'entassement des boîtes de gélose, pour leur permettre d'atteindre rapidement la température de l'incubateur.
- (h) Compter les colonies le plus tôt possible après la période d'incubation.

- (i) Choisir pour le dénombrement les boîtes de gélose qui donnent de 30 à 300 colonies, y compris les colonies minuscules. Si le nombre de colonies ne se situe pas dans ces limites, choisir les boîtes qui contiennent le nombre de colonies s'en rapprochant le plus.

3.4.2 Inscription des résultats

- (a) Calculer le dénombrement moyen (moyenne arithmétique) des boîtes en double en suivant les exemples du Tableau 5-1: Standard Methods for the Examination of Dairy Products, A.P.H.A., 14^e édition (E.H. Marth, Éditeur, 1978).
- (b) Pour les résultats finals, arrondir les dénombrements à deux chiffres significatifs et inscrire seulement les deux premiers chiffres de gauche (par exemple, inscrire 2 850 comme étant 2 900).
- (c) Si la dilution la plus faible qui a étéensemencée ne présente pas de colonies, inscrire la numération comme étant le produit de 0,5 X le facteur de dilution précédé d'un signe "plus petit que" (<).
- (d) Utiliser la formule suivante pour calculer la numération des colonies aérobies (ACC): $N=AxD$, N étant le nombre de colonies par g ou ml de produit, A le dénombrement moyen et D le facteur de dilution respectif.

3.5 Détermination des coliformes

Analyser dix unités d'échantillonnage d'eau ou de glace.

3.5.1 Épreuve de présomption

- (a) Le milieu utilisé est un bouillon de lauryl-sulfate-tryptose (LST), réparti en volume de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules à gaz (éprouvettes de Durham renversées).
- (b) 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 ensemenecer.
- (c) Ensemencer chacune des cinq éprouvettes renfermant du bouillon LST à teneur double avec 10 ml de l'unité d'échantillonnage non diluée (voir la section 3.3.2 ci-dessus); ensemenecer chacune des cinq éprouvettes renfermant du bouillon LST à teneur simple avec 1 ml de l'unité d'échantillonnage non diluée; et ensemenecer chacune des cinq éprouvettes renfermant du bouillon LST avec 0,1 ml de l'unité d'échantillonnage non diluée.
- (d) 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.
- (e) Incuber les éprouvettes ensemenecées de bouillon LST à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ 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 3.5.2 ci-dessous).

- (f) Incuber les éprouvettes négatives pendant 24 ± 2 h supplémentaires, inscrire le nombre d'éprouvettes positives, l'ajouter aux résultats obtenus à l'étape (e) ci-dessus, et commencer l'épreuve de confirmation pour les éprouvettes positives supplémentaires.
- (g) S'il n'y a pas eu formation de gaz dans toutes les éprouvettes après 48 ± 2 h, l'épreuve de présomption est négative.
- (h) Calculer le "NPP" de coliformes présumés par 100 ml d'eau ou de glace décongelée en suivant les instructions données dans la partie 5, pour convertir le nombre d'éprouvettes positives (contenant du gaz) en NPP. Inscrive les résultats.

3.5.2 Épreuve de confirmation

- (a) Le milieu utilisé est le bouillon BGLB réparti en volumes de 10 ml dans des éprouvettes contenant des ampoules à gaz.
- (b) Soumettre à l'épreuve de confirmation toutes les éprouvettes contenant du bouillon LST qui sont positives.
- (c) Mélanger le contenu des éprouvettes de bouillon LST positives par agitation ou par rotation, etensemencer 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).
- (d) 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.
- (e) Incuber les éprouvettesensemencées de bouillon BGLB à $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ pendant 24 ± 2 h. Examiner s'il y a formation de gaz et inscrire les résultats.
- (f) Si les résultats sont négatifs, incuber les éprouvettes négatives pendant 24 ± 2 h supplémentaires, examiner, inscrire le nombre d'éprouvettes positives supplémentaires (contenant du gaz) et l'ajouter aux résultats obtenus à l'étape (e) ci-dessus.
- (g) S'il y a eu formation de gaz dans les 48 ± 2 h d'incubation, l'épreuve de confirmation est positive.
- (h) Calculer le "NPP" de coliformes confirmés par 100 ml d'eau présentée dans des contenants hermétiques ou par 100 g de glace décongelée en suivant les instructions données dans la partie 5, pour convertir le nombre d'éprouvettes positives (contenant du gaz) en valeurs NPP. Inscrive les résultats.

4. INTERPRÉTATION

- 4.1 Les limites tolérées telles que spécifiées ci-après, représentant le dénombrement maximal de bactéries aérobies (numération des colonies aérobies) dans l'eau présentée dans des contenants hermétiques (à l'exclusion de l'eau minérale et de l'eau de source) et le taux probable maximal de bactéries coliformes (coliformes) dans l'eau présentée dans des contenants hermétiques et dans la glace pré-emballée, doivent être utilisées pour déterminer si le lot de produit examiné est conforme aux articles B.12.004 et B.12.005 des Règlements sur les aliments et drogues.

- 4.1.1 Le dénombrement maximal permis pour chaque lot d'eau présentée dans des contenants

hermétiques est représenté par une numération de colonies aérobies ne dépassant pas:

- (a) 100 par ml dans plus de deux des cinq unités d'échantillonnage et
- (b) 10 000 par ml dans n'importe quelle unité d'échantillonnage, comprises dans l'échantillon prélevé sur un lot.

4.1.2 Les bactéries coliformes (coliformes) sont considérées comme étant absentes d'un lot lorsqu'au plus une des dix unités d'échantillonnage prélevées sur un lot est positive à l'égard des coliformes et que le NPP de cette même unité d'échantillonnage n'excède pas 10 coliformes par 100 ml d'eau présentée dans des contenants hermétiques ou par 100 g de glace pré-emballée.

4.1.3 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>
1)	Pour l'eau présentée dans des contenants hermétiques		
	Numération des colonies aérobies	5	210010 000
	Coliformes 10	1	0 10
2)	Pour la glace pré-emballée		
	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 pour cela enfreindre les Règlements.

m = Nombre maximal de bactéries par unité désignée* qui ne présente aucun danger (niveau tolérable de contamination).

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

* par ml pour la numération des colonies aérobies; par 100 ml ou g pour les coliformes.

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 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 le 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 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, ou ml 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)

1. Si l'on a fait seulement 3 dilutions, utiliser les résultats des 3 dilutions pour calculer le NPP. Exemples a et b.
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 à l'essai) dans laquelle toutes les cinq éprouvettes sont positives et les 2 dilutions supérieures subséquentes. Exemples c et d.
3. Lorsqu'on a fait plus de 3 dilutions, dont aucune ne donne 5 éprouvettes positives, utiliser les 3 premières dilutions. Exemple e.

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. Si les éprouvettes de tous les ensembles d'une série de dilution 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-I et chercher la valeur correspondant au nombre d'éprouvettes positives obtenues.

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

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

<u>Pos*</u> 10;1;0,1	NPP	<u>Pos*</u> 10;1;0,1	NPP	<u>Pos*</u> 10;1;0,1	NPP	<u>Pos*</u> 10;1;0,1	NPP	<u>Pos*</u> 10;1;0,1	NPP	<u>Pos*</u> 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	17	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.

TABLEAU A-2

Dilutions à employer et calcul du NPP par/100 ml d'eau ou 100 g de glace

	<u>Dilutions*</u>				Combi- naison à intermediaire	NPP du tableau ou ml	Facteur de dilu- tion de l'ensemble	NPP par g	
	Non dilué	1:10	1:100	1:1000					
Quantité réelle de produit à l'essai (g ou ml)	10	1	0,1	0,01	A-1				
a.	<u>5/5**</u>	<u>5/5</u>	<u>2/5</u>		5-5-2	540	1	5.4	
b.		<u>5/5</u>	<u>5/5</u>	<u>2/5</u>	5-5-2	540	10	54	
c.		5/5	<u>5/5</u>	<u>2/5</u>	<u>2/5</u>	5-2-2	95	100	95
d.		5/5	<u>5/5</u>	<u>2/5</u>	<u>0/5</u>	5-2-0	49	100	49
e.		<u>2/5</u>	<u>2/5</u>	<u>1/5</u>	0/5	2-2-1	12	10	1.2
f.		<u>5/5</u>	<u>2/5</u>	<u>1/5</u>	1/5***	5-2-2	95	10	9.5
g.		5/5	<u>5/5</u>	<u>5/5</u>	<u>5/5</u>	5-5-5	>1600	100	>1600

* Les dilutions à employer sont soulignées.

** Nombre d'éprouvettes positives/nombre d'éprouvettes ensemencées.

*** Voir page 10, numéro 4.