



Normalisation d'une méthode de dénombrement des spores bactériennes

Démarche pour normaliser une méthode d'analyse développée avec et pour les professionnels de la conserve par le CTCPA

Ecrit par : Stéphane André ¹, chef de projet Microbiologie, Maëlle Vigneron ¹, responsable communication marketing.
(1) CTCPA, ZA Aéroport, Site Agroparc, BP 21203, 84911 Avignon cedex 9. Tél : 04 90 84 32 00

L'Afnor a publié en mai 2011 la norme d'une méthode de dénombrement des spores bactériennes rédigée et financée par le CTCPA sous la référence NF V08-602. Développée par le centre technique dans les années 90, cette méthode résultait d'un besoin des entreprises de suivre facilement les germes spécifiques aux altérations des produits appertisés. La normalisation permet d'officialiser cette méthode et de l'inclure dans des cahiers des charges fournisseurs.

Résumé : En tant que centre technique des fabricants de conserves alimentaires, le CTCPA développe régulièrement de nouvelles méthodes d'analyses spécifiques aux besoins industriels de contrôle qualité des conserves. A la fin des années 90, le CTCPA avait ainsi mis au point une méthode de dénombrement des spores bactériennes qui permet de suivre les germes thermorésistants responsables d'altération dans les matières premières, les prélèvements sur ligne, les eaux de process et les produits traités. Cette méthode a été diffusée aux entreprises. Cependant, en 2010, les entreprises du domaine de l'appertisé ont souhaité que le CTCPA fasse les démarches pour retranscrire cette méthode en norme officielle afin qu'elle soit utilisable par le plus grand nombre et qu'elle puisse être précisée dans des cahiers des charges, par exemple des matières premières. Le processus de normalisation a consisté à valider la pertinence des choix techniques (sélection thermique, durée d'incubation) et sa répétabilité sur des échantillons variés : prélèvements de surface, eaux de process, produits humides et secs. Après rédaction d'une proposition de norme par un groupe de travail réunissant experts du CTCPA et professionnels, créé spécialement pour l'occasion, la méthode a été normalisée par l'Afnor en mai 2011 sous la référence NF V08-602 « Microbiologie des aliments- Dénombrement des spores dans les produits alimentaires avant traitement d'appertisation, surfaces et eaux de process – dénombrement des spores aérobies mésophiles, anaérobies mésophiles, aérobies thermophiles, anaérobies thermophiles par comptage de colonies ». Cette démarche est un exemple du rôle d'appui que joue le centre technique auprès des entreprises de l'appertisé dans le cadre de la valorisation de ses actions de recherche collective.

INTRODUCTION

Un système très répandu.

Les industriels du secteur appertisé désirent suivre les contaminations en germes d'altération, notamment les spores thermorésistantes, dans les matières premières ou les prélèvements d'usine, afin de mettre en place des actions préventives voire correctives en cas de dérive. Ces professionnels ont donc confié au CTCPA dans les années 90 la mise au point d'une nouvelle méthode d'analyse qui correspondait explicitement à leurs besoins et leurs contraintes d'utilisation en routine. Cette méthode devait être applicable sur différents types d'échantillons (matières premières, eaux de process...), rapide et peu coûteuse. Elle était depuis utilisée par le CTCPA et les professionnels. Le Centre technique a été de nouveau missionné en 2010 pour

obtenir la normalisation de cette méthode. Outre une rédaction précise dans le respect des indications de l'Association française de normalisation (Afnor), la démarche de normalisation a dû répondre à deux questions :

- le protocole appliqué est-il cohérent par rapport aux objectifs souhaités ?
- la méthode est-elle répétable pour garantir l'homogénéité des résultats entre laboratoires ?

Ce projet de normalisation a donc visé à confirmer la méthodologie mise au point, puis à la retranscrire en norme officielle au travers d'un groupe de travail créé spécialement pour l'occasion.

1. DEVELOPPEMENT DE LA METHODE ET NORMALISATION : UNE DEMANDE DES PROFESSIONNELS DE LA FILIERE APPERTISEE

1.1. Enjeux qualité et industriels de la méthode de dénombrement

La maîtrise de la qualité des produits appertisés se décline en différents points-clés : traitement thermique, sertissage, nettoyage, La présence de spores bactériennes thermorésistantes de germes d'altération, sans risque pour la santé, est utilisée aujourd'hui comme indicateur de l'hygiène des lignes de transformation. Depuis sa création, le CTCPA travaille avec les professionnels pour suivre et identifier ces contaminations via l'analyse des cas de non-stabilité révélés après stockage, incubation à 37°C ou 55°C ou lors de diagnostics microbiologiques de ligne.

Le centre technique a développé une forte connaissance sur ces germes thermorésistants et leur comportement en fonction des conditions industrielles auxquelles ils sont soumis (température, thermorésistance, ...). Leur particularité première est que le traitement thermique d'appertisation s'avère parfois insuffisant pour stabiliser le produit. Pour cela il est nécessaire de maîtriser la contamination en spores avant le traitement assainissant. Ces contaminations proviennent directement de la matière première ou résultent d'accumulations et/ou de prolifération microbienne sur la ligne de production dans des zones chaudes ou difficiles à nettoyer en amont du

1.2. Enjeux de la démarche de normalisation

Comme expliqué précédemment, les contaminations en spores bactériennes responsables d'altération proviennent de la matière première ou de contaminations croisées au long de la ligne de production. Ceci constitue un enjeu pour les industriels au niveau de leurs relations avec les fournisseurs de matière première mais aussi de produits de nettoyage-désinfection. Pour contractualiser un critère microbiologique maximum, il était indispensable d'avoir

conditionnement. Il est donc important de pouvoir suivre ces contaminations dans les matières premières et sur les lignes pour identifier les sources de contamination et de procéder si besoin à des actions correctives.

Les méthodes d'analyses normées existantes étaient insuffisantes par rapport à ce besoin. Par exemple, la norme pour le dénombrement des spores thermorésistantes de *Bacillus* et *Clostridium* thermophiles (NF V08-407) ne couvre pas l'ensemble des germes susceptibles d'être à l'origine d'une altération d'un produit appertisé ; elle est difficile à réaliser en routine car elle nécessite un nombre élevé de tubes et une durée d'incubation de huit jours. C'est pourquoi le CTCPA a développé pour les entreprises de l'appertisé une méthode de dénombrement des spores bactériennes de germes d'altération qui couvre l'ensemble des germes identifiés par le centre technique au cours des analyses de produits non-stables. Elle s'applique aux produits secs, humides, aux liquides (jus et eaux de process) et répond bien aux besoins spécifiques de la filière en termes de délai de réponse et de spécificité. Cette méthode a prouvé son efficacité depuis une dizaine d'années pour répondre à ces besoins industriels.

une méthode normée faisant référence dans les cahiers des charges des fournisseurs. Les professionnels ont donc missionné le CTCPA une seconde fois sur ce thème pour officialiser cette méthode par la normalisation auprès de l'Afnor. La normalisation permet en effet de préciser des limites de contamination et d'assurer que tous les résultats d'analyse sont équivalents puisqu'utilisant la même méthode normalisée.

2. DEROULEMENT DE LA METHODE D'ANALYSE DEVELOPEE

La méthode développée est applicable aux prélèvements de surface réalisés sur ligne, aux produits humides, aux produits secs et aux eaux de process. Elle permet de

dénombrer les spores aérobies et anaérobies, thermophiles et mésophiles, soit quatre types de comportement microbien différents.

Tableau 1 : Etapes de la méthode de dénombrement et enjeux

Etape	Méthode	Enjeu
1- Préparation des échantillons	Par dilution <i>conformément aux recommandations de la norme NF EN ISO 6887</i>	
2- Sélection thermique	10 minutes ou 30 minutes <i>conformément aux recommandations de la norme NF V08-250</i>	Selon la thermorésistance des germes à dénombrer. Doit être spécifique pour n'obtenir que les germes souhaités.
3- Culture sur gélose – incubation	Sur deux milieux différents pour les conditions aérobies et anaérobies A deux températures différentes pour les thermophiles et les mésophiles TOTAL : 4 types d'incubation	Température de culture optimale pour garantir le développement d'une colonie. Durée d'incubation nécessaire et suffisante (si trop court : risque de sous-estimation de la contamination, si trop long : contraignant pour une analyse de routine)
4- Comptage	Toutes les colonies des géloses contenant entre 10 et 300 germes sont prises en compte. Si le nombre de colonies est inférieur à 10 sur la gélose correspondant à la dilution la plus faible, la population est estimée <i>conformément aux recommandations de la norme NF EN IS 7218</i> .	Répétabilité des résultats.

On distingue aisément les différents enjeux techniques de la méthode, qui doivent être justifiés dans le dossier de normalisation. Ils associent une pertinence technique à des contraintes industrielles de délai qui expliquent l'intérêt des professionnels à être associés au projet. Le CTCPA a les moyens de garantir la pertinence technique grâce aux

connaissances accumulées, tout en étant à l'écoute des contraintes des professionnels. La méthode développée dans les années 90 a répondu à ces besoins, sa normalisation suivant les exigences de l'Afnor constituait une seconde étape.

3. ETAPES-CLES DE LA NORMALISATION AVEC L'AFNOR

3.1 Constitution d'un groupe de travail

Les projets de recherche du CTCPA sont choisis et suivis par les professionnels de la filière des produits appertisés qui se sont donc révélés très moteurs dès le début du projet de normalisation. Une fois la demande de normalisation faite à l'Afnor, l'Association a réalisé un appel à experts pour travailler sur le projet. Le groupe de travail comprenait des professionnels de l'appertisé (Bonduelle,

William Saurin), de laboratoires privés (Eurofins, Solabia) ainsi que des personnes du CTCPA et de l'Afnor.

Il s'est réuni une fois en mai 2010 et a approuvé le projet de norme présenté par le CTCPA sur la méthode de dénombrement des spores aérobies mésophiles, anaérobies mésophiles, aérobies thermophiles et anaérobies thermophiles par comptage de colonies.

3.2. Validation de la pertinence technique de la méthode : exemple de la durée d'incubation

La durée d'incubation des milieux de dénombrement des spores anaérobies thermophiles avant comptage des colonies a fait l'objet d'essais, au moment de la mise en place de la méthode puis pour la constitution du dossier de

normalisation. Les bactéries sporulées présentent des temps de latence souvent longs. De ce fait, standardiser toutes les durées d'incubation des géloses à deux jours paraissait risqué, bien que cela soit pratiqué dans certains

laboratoires. Par ailleurs, une autre méthode (nombre le plus probable) définissait une durée d'incubation de huit jours. La question était donc de savoir quelle durée était nécessaire et suffisante. Pour cela, les dénombrements des spores anaérobies thermophiles ont été réalisés à partir de mêmes échantillons traités dix ou trente minutes à 100°C, étalés sur deux milieux, et après deux, cinq et sept jours d'incubation en anaérobiose. Les résultats ont montré que des colonies apparaissent dans les quatre cas entre deux et cinq jours d'incubation. En revanche, la prolongation de l'incubation au-delà de cinq jours n'augmentait pas le nombre de colonies. La durée d'incubation de cinq jours est donc optimale.

3.3. Validation de la répétabilité

Des échantillons appartenant aux différentes catégories définies pour la norme (aliments humides, aliments secs, prélèvements de surface, eaux de process) ont servi à évaluer la répétabilité du dénombrement.

Pour chaque catégorie d'échantillon, trois niveaux différents de contamination ont été ciblés (sauf pour les eaux de process où un seul niveau a été testé), représentant 10 échantillons différents. Chaque échantillon a subi cinq analyses différentes (2 géloses de culture, 2 températures

3.4. Suivi de la normalisation auprès de l'Afnor

Une fois le projet de norme approuvé par le groupe de travail et après accord de la Commission plénière Microbiologie, une enquête publique a été mise en place par l'Afnor. L'enquête a été ouverte entre le 6 août et le 5 novembre 2010. La réunion de dépouillement a eu lieu en Commission plénière.

Des modifications de la norme ont été demandées dont les principales sont :

- extension du champ d'application aux produits pasteurisés à conservation réfrigérée, à condition

CONCLUSION

Le projet mené en 2010 sur la normalisation de la méthode de dénombrement des spores de germes d'altération a été un vif succès pour les professionnels comme pour le CTCPA qui a géré concrètement la démarche. Ce projet a bénéficié de l'organisation issue du statut de centre technique industriel : proximité et implication forte des entreprises, mutualisation des moyens financiers et techniques, mais aussi expertise scientifique et technique

Des essais avaient été menés également en suivant la méthode du nombre le plus probable avec incubation à 55°C en anaérobiose. Les résultats ont montré des cas d'évolution correspondant à la période d'incubation entre cinq et sept jours. Pour cette méthode du nombre le plus probable, l'incubation de huit jours a donc paru justifiée.

Le même type de démarche a été mené pour choisir la durée de l'épreuve de sélection thermique (10 ou 30 minutes). Aucune différence significative n'a été révélée par ces essais. Pour le protocole normalisé, une durée de sélection thermique de 10 minutes, régulièrement observée dans les autres normes, a donc été proposée.

d'incubation et 2 temps d'incubation pour les germes anaérobies) répétées chacune trois fois, correspondant donc à 150 analyses.

Les résultats (non reportés ici) montrent une très bonne répétabilité des essais, quelle que soit la population ciblée et quel que soit son niveau de contamination. Ces résultats confirment par ailleurs la nécessité d'une incubation des géloses des spores anaérobies thermophiles de cinq jours.

d'ajuster l'épreuve de sélection thermique (10 min à 80°C)

- ajout de critères de performance pour les milieux.

Quatre tests de productivité ont été ajoutés, un par type de spores. Chaque test définit l'incubation, l'espèce à rechercher, le milieu de référence, la méthode de contrôle et le ratio de productivité attendu. Avec ces modifications, la norme a été transmise et est publiée depuis mai 2011.

acquise au cours des projets menés pour la filière. Aujourd'hui, la norme est utilisable par tous, qu'ils soient fabricants de produits alimentaires, laboratoires d'analyses ou fournisseurs de matières premières. Avec une méthode partagée, tous peuvent parler le même langage et contribuer ensemble à l'amélioration de la qualité des produits alimentaires.

ANNEXES

Titre complet de la norme :

NF V08-602 « microbiologie des aliments – Dénombrement des spores dans les produits alimentaires avant traitement d'appertisation, surfaces et eaux de process – Dénombrement des spores aérobies mésophiles, anaérobies mésophiles, aérobies thermophiles, anaérobies thermophiles par comptage de colonies »

Sommaire de la norme

- 1- Domaine d'application
- 2- Références normatives
- 3- Termes et définitions
- 4- Principe
- 5- Milieux de culture
- 6- Appareillage et verrerie
- 7- Mode opératoire
- 8- Expression des résultats

Acheter la norme - boutique Afnor

http://www.boutique.afnor.org/NEL5DetailNormeEnLigne.aspx?CLE_ART=FA169301&nivCtx=NELZNELZ1A10A101A107&ts=9437313

