



**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS
OTTAWA**

ISOLEMENT ET NUMÉRATION DE *BACILLUS CEREUS* DANS LES ALIMENTS

Donna Douey
Laboratoire de Calgary
Agence canadienne d'inspection des aliments
3650 36th St. N.W.
Calgary, AB
T2L 2L1

Courriel : doueyd@inspection.gc.ca

Irène Iugovaz
Microbiologie alimentaire
Direction générale des produits de santé et des
aliments (DGPSA)
Santé Canada,
1001, St-Laurent ouest,
Longueuil, Québec, J4K 1C7

Courriel : irene_iugovaz@hc-sc.gc.ca

R. A. Szabo
Division de l'évaluation microbiologique
Bureau des dangers microbiens, DGPSA
Localisateur postal : 2204A1
Ottawa, Ontario, K1A 0L2

Courriel : Rick_Sazbo@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

La présente méthode s'applique à l'isolement, l'identification et la numération de *Bacillus cereus* (avec les restrictions telles que décrites dans la méthode) dans les aliments conformément aux exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-42 de septembre 1997.

2. DESCRIPTION

Cette méthode donne des résultats satisfaisants avec les aliments naturellement contaminés comme les viandes, les légumes, les produits laitiers, les céréales et les aliments déshydratés (8.5).

3. PRINCIPE

Bacillus cereus est très répandu dans la nature et est retrouvé habituellement dans une variété d'aliments. Lorsque *B. cereus* croît en grande quantité dans un aliment ($> 10^6/g$), une quantité d'entérotoxine suffisante peut être produite pouvant causer une intoxication d'origine alimentaire. La présente méthode permet de déterminer la présence de *B. cereus* en ensemençant des quantités connues (dilutions) d'un échantillon

d'aliment sur la surface d'une gélose sélective. Après incubation, des colonies présumées de *B. cereus* sont prélevées et soumises à des épreuves de confirmation. Les résultats obtenus permettent de calculer le nombre de *B. cereus* par g or ml d'aliment.

NOTA : *B. cereus* se distingue difficilement des autres microorganismes similaires dans le Groupe *B. cereus*. Une caractéristique de *B. mycoides* est la production de colonies rhizoïdes sur géloses et *B. anthracis* est non mobile et non hémolytique. Cependant, les souches atypiques de *B. cereus* ont une motilité et une hémolyse variables et des tests supplémentaires peuvent être nécessaires afin d'identifier les isolats. Tenir compte de la provenance de l'échantillon lors de l'identification d'isolats de *B. cereus*. Seuls *B. cereus* et *B. thuringiensis* sont susceptibles d'apparaître naturellement dans les produits alimentaires.

4. DÉFINITIONS DES TERMES

Voir l'annexe A du volume 3 (8.4)

5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3 (8.4)

6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux et réactifs suivants (1-5) sont disponibles commercialement et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir aussi l'annexe G du volume 3 ainsi que la section 9 pour la formulation des milieux individuels.

- 1) Diluant à l'eau peptonée
- 2) Solution de citrate à 2 %, pré chauffée à 45 °C (pour le fromage)
- 3) Bouillon de trypticase soja (TSB)
- 4) Boîtes de gélose nutritive
- 5) Gélose polymyxine, pyruvate, jaune d'oeuf, mannitol, bleu de bromothymol (milieu PEMBA)
- 6) Boîtes de gélose au sang (gélose TSB avec 5 % de sang de mouton)
- 7) Bouillon de sporulation (9.1) ou gélose de TSA-MnSO₄ (facultatif)
- 8) Solution de coloration (facultatif) : vert malachite, solution aqueuse de 5 %; safranine, solution aqueuse de 0,5 %; noir de soudan B, 0,3 % dans 70 % d'éthanol; xylo
- 9) Fuchsine basique, solution aqueuse de 0,5 % OU colorant fuchsine phénatée ZN, TB (Difco) [cristaux de toxines protéiques]

Nota : La fuchsine basique et le colorant fuchsine phénatée ZN, TB sont toxiques et peuvent être cancérogènes. Utiliser les mesures de sécurité appropriées. L'achat de produits offerts sur le marché est recommandé.

- 10) Méthanol [cristaux de toxines protéiques]
- 11) Milieu de motilité BC (9.2)
- 12) Trousses d'identification rapide (facultatif)
- 13) Cultures de contrôle, ATCC ou l'équivalent

- 14) Mélangeur, stomacher ou équivalent
- 15) Microscope
- 16) Incubateurs capables de maintenir une température de 30 °C et 35 °C

NOTA : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont 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 à 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. Des températures plus élevées peuvent être létales pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

7. MARCHE À SUIVRE

Chaque unité d'échantillonnage doit être analysée individuellement. Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes :

AVIS DE SÉCURITÉ : Le milieu PEMBA soutient la croissance de *B. anthracis*. Aucune différence morphologique évidente n'apparaîtra entre certaines souches de *B. cereus* et de *B. anthracis*. Prendre les précautions appropriées.

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Selon le type de produit, il faut garder les échantillons au réfrigérateur (0-5 °C) ou au congélateur lors du transport, à l'exception des produits stables à la température ambiante. Décongeler les échantillons au réfrigérateur ou dans des conditions de temps et de température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage dès que possible après leur réception au laboratoire.

7.2 Préparation des dilutions

- 7.2.1 Pour s'assurer que l'unité d'analyse d'un échantillon solide est représentative, combiner des prélèvements de différents endroits à l'intérieur de l'unité d'échantillonnage solide.
- 7.2.2 Lorsque l'unité d'échantillonnage est un liquide ou un solide à écoulement libre (poudre), mélanger complètement chaque unité d'échantillonnage en agitant le contenant.
- 7.2.3 Préparer une dilution 1:10 de l'aliment en ajoutant de manière aseptique 11 (10) g ou ml (l'unité d'analyse) à 99 (90) ml du diluant (Tableau 1). Agiter, mélanger (avec un stomacher ou autre) selon le type d'aliment, comme indiqué au Tableau 1.

Nota : Le poids ou le volume entre parenthèses indique une procédure alternative pour la préparation des dilutions.

- 7.2.4 L'homogénat (dilution 1:10) d'aliments secs devrait être maintenu à la température ambiante pendant 15 minutes. Dans tous les autres cas, l'analyse devrait se poursuivre aussitôt que possible.
- 7.2.5 Pour éviter de surchauffer, mélanger le tout pendant le temps minimal requis afin

d'obtenir une suspension homogène; le temps de mélange au stomacher ou autre mélangeur ne devrait pas excéder 2 minutes. Pour les aliments qui tendent à former une mousse, utiliser le mélangeur à faible vitesse et prélever l'aliquote sous l'interface liquide-mousse.

- 7.2.6 Si la dilution 1:10 doit être mélangée en agitant, agiter le flacon de dilution 25 fois en effectuant un arc de 30 cm sur une durée approximative de 7 secondes.
- 7.2.7 Préparer les dilutions décimales successives requises en utilisant une pipette stérile différente pour chaque transfert.
- 7.2.8 Agiter toutes les dilutions (comme en 7.2.6) immédiatement avant le transfert afin d'assurer une distribution uniforme des micro-organismes présents.

7.3 **Numération des *B. cereus* présumés**

7.3.1 **Ensemencement**

7.3.1.1 Faire sécher les plaques PEMBA dans une hotte biologique ou une hotte à flux lumineaire immédiatement avant leur utilisation. Agiter chaque dilution afin de remettre en suspension les aliments qui auraient pu se déposer pendant la préparation. L'ensemencement devrait s'effectuer moins de 15 minutes après la préparation des dilutions.

7.3.1.2 **Aliments solides**

- (i) Si on prévoit moins de 1 000 *B. cereus* par g : étaler de façon uniforme 0,2 ml de la dilution 1:10 sur la surface de chacune des dix plaques de la gélose sélective (PEMBA).
- (ii) De routine, ou si le compte prévu est supérieur à 1 000 *B. cereus* par g : étaler 0,2 ml de chaque dilution sur chaque plaque en double de PEMBA.

7.3.1.3 **Échantillons liquides**

Si les unités d'échantillonnages sont liquides, 0,2 ml de l'unité analytique non diluée peut être étalé sur chacune des plaques en double de PEMBA.

NOTA : Le liquide ne devrait pas être étalé sur les côtés de la plaque, car cela cause une croissance confluyente à l'interface boîte-gélose, ce qui est difficile à compter.
--

7.3.1.4 Conserver les plaques dans une position verticale jusqu'à ce que l'inoculum soit absorbé par le milieu de culture (environ 10 minutes sur des plaques correctement séchées). Si l'inoculum n'est pas immédiatement absorbé par le milieu de culture, les plaques peuvent être placées en position verticale dans un incubateur pour une période pouvant aller jusqu'à une heure.

7.3.2 **Incubation**

7.3.2.1 Inverser les plaques et incuber à 35 °C pendant 24 h ± 2 heures.

7.3.2.2 Éviter d'empiler ou d'entasser les plaques afin qu'elles atteignent rapidement et uniformément la température de l'incubateur.

- 7.3.2.3 Examiner les plaques afin d'y déceler des colonies présumées de *B. cereus*. Compter le nombre de colonies présumées de *B. cereus* présentes (Section 7.3.3). Incuber à nouveau les plaques à la température de la pièce pendant un autre 24 h et examiner à nouveau.

Conseil utile : Après 24 h, encercler les colonies présumées. Après 48 h, rechercher les colonies qui n'étaient pas présentes après 24h et additionner-les à la numération de 24 h. À cause de la sur croissance des colonies, il pourrait sembler y avoir moins de colonies après 48 h. Dans ce cas, la numération de 24 h est plus précise.

7.3.3 Numération des colonies et enregistrement des résultats

Nota : Sur PEMBA, *B. anthracis* (et certaines souches de *B. cereus*) présente très peu ou pas du tout de zone de précipité de jaune d'oeuf. Les colonies de *B. anthracis* peuvent sembler plus petites, plus blanches et plus en relief que *B. cereus*.

- 7.3.3.1 Compter les colonies immédiatement après la période d'incubation. Chercher les deux types suivants de colonies présumées de *B. cereus* sur PEMBA :

- Type 1: Bordures irrégulières, fimbriées ou légèrement rhizoïdales, d'un diamètre de 2 à 5 mm, de couleur turquoise à bleu paon (intensité variable), présentant une surface en verre plat dépoli et entourée d'un halo de couleur grise à turquoise de précipité dense (réaction du jaune d'oeuf) qui peut virer au bleu paon après 48 h d'incubation.
- Type 2: Colonies similaires au type 1 mais sans halo de précipitation.

7.3.3.2 Numération des dix plaques de la dilution 1:10 (aliments solides seulement)

- 7.3.3.2(a) Si le nombre de colonies présumées de *B. cereus* par plaque est inférieur à 20, additionner séparément les numérations de chaque type pour les 10 plaques et consigner-les comme étant la numération présumée respective. Il s'agit de la numération d'un des deux types par 2 ml (0,2 g d'aliment) (B). Multiplier la numération par 5 et consigner comme étant la numération présumée respective par g d'aliment (C). Additionner les résultats et les rapporter comme étant la numération présumée totale par g d'aliment.
- 7.3.3.2(b) Si le nombre de toutes les colonies présumées de *B. cereus* est supérieur à 20 par plaque, mais que le total des deux types n'excède pas 200, sélectionner deux plaques au hasard, compter les colonies de chaque type séparément et calculer la numération présumée moyenne respective par plaque (par 0,2 ml) (A/2). Multiplier chaque numération par 50 et consigner comme étant la numération présumée respective par g d'aliment (C). Additionner les résultats et rapporter comme étant la numération présumée totale par g d'aliment.
- 7.3.3.2(c) Si le nombre de colonies présumées de *B. cereus* sur certaines des dix plaques est < 20, mais qu'il est ≥ 20 sur les autres, procéder

comme dans la section 7.3.3.2(a) ci-dessus.

7.3.3.3 Numération de plaques en double (n'importe quelle dilution)

- 7.3.3.3(a) Choisir les plaques qui donnent de 20 à 200 colonies présumées de *B. cereus* par plaque comprenant les numérations combinées des deux types. Une plage alternative de numération de 10 à 100 ou de 10 à 150 peut être utilisée, car ces plages sont recommandées dans d'autres méthodes normalisées en raison de la tendance naturelle qu'ont les colonies *Bacillus* à s'étendre.
- 7.3.3.3(b) Calculer le nombre présumé moyen par plaque pour chaque type (A/2), multiplier par 5 ainsi que par le facteur de dilution approprié, et consigner comme étant la numération présumée par g ou ml d'aliment pour chaque type (C). Additionner les résultats et consigner comme étant la numération présumée totale par g or ml d'aliment.
- 7.3.3.3(c) Si les plaques de plus d'une dilution sont utilisées, la moyenne des numérations doit être faite telle que montrée ci-dessous (Section 7.3.3.4)
- 7.3.3.3(d) Si aucune plaque contenant de 20 à 200 colonies présumées de *B. cereus* n'est disponible, des numérations estimées peuvent être faites sur des plaques dont les numérations présumées se situent en dehors de cette plage. Rapporter les résultats comme des numérations estimées lorsque les résultats se situent à l'extérieur de la plage de 20 à 200.
- 7.3.3.3(e) Lorsqu'une numération estimée contribue à une numération moyenne, cette moyenne devient elle-même une valeur estimée.

7.3.3.4 Établissement de la moyenne de numération de deux dilutions

- 7.3.3.4(a) Si les plaques de deux dilutions décimales consécutives comprennent des numérations à l'intérieur de la plage de 20 à 200 colonies présumées de *B. cereus* par plaque, les numérations des quatre plaques devraient être utilisées pour obtenir le compte moyen. Dans la mesure où les deux types différents doivent être comptés séparément et qu'il soit bien souvent possible que les numérations individuelles soient inférieures à 20, et bien que les numérations combinées soient à l'intérieur de la **plage, des valeurs estimées et des valeurs réelles devraient être combinées** afin d'obtenir une valeur moyenne. L'emploi de la formule suivante permet d'éviter cette situation :

$$\text{Numération moyenne de colonies/g or ml} = \frac{\text{Nombre total de colonies comptées}}{\text{Volume utilisé par dilution} \left(\frac{1}{\text{dilution}_1} + \frac{1}{\text{dilution}_2} \right)}$$

Pour un exemple de colonies comptées, voir le Tableau II.

- 7.3.3.4(b) Si aucune colonie présumée de *B. cereus* n'est obtenue, consigner les numérations présumées comme < 5 par g or ml pour les dix plaques de la dilution 1:10, ou < 2,5 x le facteur de dilution pour les plaques en double.

7.4 Confirmation

7.4.1 Sélection des colonies

7.4.1.1 À partir des plaques comptées, un certain nombre de chaque type de colonie observée est choisi selon les critères suivants :

- a) Lorsque la numération totale par type pour toutes les plaques d'une dilution est inférieure à cinq, prélever toutes les colonies de ce type.
- b) Lorsque la numération totale par type pour toutes les plaques d'une dilution est égale ou supérieure à cinq colonies, prélever cinq colonies de ce type au hasard.

7.4.2 Dépistage de *B. cereus* / *B. thuringiensis*

Il est recommandé d'ensemencer en stries les colonies suspectes sur de la gélose non sélective (gélose nutritive ou au sang) pour la pureté. Inoculer 5 ml du bouillon de trypticase-soja (TSB) avec les colonies suspectes et les témoins appropriés, et incubé pendant 18 h à 30 °C.

7.4.2.1 Mobilité (8.3)

Inoculer le milieu de mobilité BC par piqûre profonde au centre du tube avec une anse de 3 mm d'une culture en suspension de 24 h. Incuber les tubes de 18 à 24 h à 30 °C et examiner pour le type de croissance le long de la ligne d'ensemencement. La plupart des souches de *B. cereus* et de *B. thuringiensis* se déplacent au moyen de flagelles péritriches, et produisent une croissance diffuse dans le milieu, éloignée de la ligne d'ensemencement. *B. anthracis* et toutes les souches de *B. mycoides*, à l'exception de quelques-unes, ne sont pas mobiles.

NOTA : Quelques souches de <i>B. cereus</i> ne sont pas mobiles.

7.4.2.2 Croissance rizhoïde (8.3)

Inoculer une plaque de gélose nutritive pré-séchée en touchant la surface près du centre du milieu de culture avec une anse de 2 mm de la culture. Laisser l'inoculum être absorbé, puis incubé la plaque dans une position verticale pendant 24 à 48 h à 30 °C. Vérifier si la plaque présente une croissance rizhoïde caractérisée par des structures semblables à des racines ou des cheveux qui peuvent s'étendre jusqu'à plusieurs cm du point d'inoculation. Ce type de croissance est typique des espèces *B. mycoides*. Les souches de *B. cereus* produisent des colonies irrégulières rugueuses qui ne devraient pas être confondues avec la croissance rizhoïde.

7.4.2.3 Activité hémolytique

Après l'incubation du bouillon, diviser une plaque de gélose sang en 6 à 8 segments égaux. Identifier chaque segment et inoculer un ou plusieurs segments près du centre en touchant délicatement la surface de la gélose avec une anse de bouillon incubé.

Laisser l'inoculum être absorbé et incubé les plaques pendant 24 h à 30 °C. Vérifier les plaques pour toute activité hémolytique.

B. cereus est normalement fortement bêta-hémolytique. *B. thuringiensis* et *B. mycoides* sont souvent faiblement bêta-hémolytiques avec production d'une hémolyse complète sous les colonies seulement. *B. anthracis* est généralement non hémolytique. Les cultures âgées peuvent présenter une faible gamma-hémolyse. Prendre les précautions appropriées si une colonie non hémolytique est isolée.

Nota : Il s'agit d'un test subjectif qui ne permet de différencier le *B. cereus* de *B. thuringiensis* ou de *B. mycoides*. Cependant, la détection d'une bêta-hémolyse éliminera le *B. anthracis*.

7.4.2.4 L'utilisation d'un système d'identification rapide tel que VITEK ou API peut être utile pour confirmer que l'isolat est *B. cereus* ou *B. thuringiensis*. Des systèmes comme le VITEK ne pourront pas différencier ces deux espèces, bien que ce système permette une bonne identification de *B. cereus* / *B. thuringiensis* (communication personnelle, Shirley Fredette, conseillère technique, BioMerieux, 2002).

Nota : Certains laboratoires ont des problèmes à différencier les réactions de coloration avec la trousse API 50CH. BioMerieux recommande l'utilisation de la trousse API 50CH conjointement avec la trousse API CHB/E. De plus, les 12 premiers tests de la trousse API 20E peuvent aider à l'identification. Vérifier auprès de votre représentant BioMerieux.

7.4.2.5 Les isolats qui sont mobiles, qui ne démontrent pas de croissance rhizoïde et qui sont hémolytiques, ont une forte probabilité d'être *B. cereus* ou *B. thuringiensis*. Les souches fortement hémolytiques sont probablement *B. cereus*. Afin de confirmer la présence de *B. cereus*, le test suivant pour les cristaux de toxines protéiques différenciera *B. cereus* de *B. thuringiensis*.

7.4.2.6 Cristaux de toxines protéiques

Inoculer des géloses nutritives inclinées avec des anses de 3 mm de cultures de 24 h de TSB. Incuber les géloses inclinées pendant 24 h à 30 °C, puis à la température ambiante pendant 2 à 3 jours. Préparer des frottis avec de l'eau distillée stérile. Laisser sécher à l'air et fixer légèrement à la chaleur. Placer la lame sur le support de coloration et submerger avec du méthanol. Laisser reposer 30 s, enlever le méthanol et laisser la lame sécher à l'air. Remettre la lame sur le support de coloration et submerger complètement avec de la fuchsine basique à 0,5 % ou le colorant fuchsine phénatée ZN, TB (Difco). Chauffer légèrement le dessous de la lame jusqu'à l'apparition de vapeur. Attendre 1 à 2 min et répéter cette dernière étape. Laisser reposer 30 s, enlever le colorant et rincer à fond avec de l'eau du robinet. Sécher la lame sans éponger et, examiner sous l'huile à immersion pour la présence de spores libres et de cristaux de toxines tétragonaux (en forme d'un diamant) colorés en foncé. Les cristaux sont généralement plus petits que les spores. Les cristaux de toxines abondent normalement dans une culture de 3 ou 4 jours de *B. thuringiensis*, mais ils ne peuvent être détectés par la technique de coloration avant que la lyse du sporange n'ait eu lieu. Pour ces motifs, à moins que les spores libres soient visibles, les cultures devraient être maintenues à la température ambiante encore quelques journées supplémentaires, puis réexaminées pour la présence de cristaux de toxines. *B. thuringiensis* produit généralement des cristaux de toxines protéiques qui peuvent être détectés par la technique de coloration, soit sous forme de cristaux libres, soit sous forme de corps d'inclusion parasporaux dans l'exosporium. *B. cereus* et les autres membres du groupe *B. cereus* ne produisent pas de cristaux de toxines protéiques.

7.4.2.7 Au besoin, confirmer à l'aide de la procédure de coloration décrite plus bas. Il est recommandé d'inclure l'étape de la sporulation avant d'effectuer la procédure.

7.4.3 Procédure de sporulation (facultatif)

7.4.3.1 Inoculer un flacon de bouillon de sporulation avec une colonie isolée de *B. cereus* présumée à partir de PEMBA.. Placer sur une plaque agitatrice (sans chaleur), desserrer le bouchon et agiter modérément à la température ambiante pendant cinq jours. Colorer tel qu'expliqué à la section 7.4.4.

7.4.3.2 Alternativement, ensemercer la colonie présumée en stries sur de la gélose de TSA-MnSO₄. Incuber à la température ambiante pendant 2 à 3 jours. Colorer tel qu'expliqué à la section 7.4.4.

7.4.4 Procédure de coloration (facultatif)

7.4.4.1 Préparer des frottis sur des lames de verre de microscope à partir du centre des colonies choisies.

7.4.4.2 Laisser sécher les frottis à l'air et fixer en les passant légèrement à la flamme.

7.4.4.3 Placer les lames sur un support de coloration et submerger avec du vert de malachite 5 % p/v.

7.4.4.4 Chauffer les lames avec une flamme légère jusqu'à ce qu'il se forme de la vapeur. Continuer à chauffer pendant 3 min en évitant de porter à ébullition la solution de coloration sur les lames.

7.4.4.5 Rincer soigneusement les lames avec de l'eau froide de robinet; assécher à l'aide de papier buvard.

7.4.4.6 Submerger les lames avec du noir de soudan B, 0,3 % p/v dans de l'éthanol à 70 %. Laisser reposer pendant 15 minutes.

7.4.4.7 Rincer soigneusement les lames avec de l'eau froide du robinet; assécher à l'aide de papier buvard.

7.4.4.8 Submerger les lames avec du xylol pendant 5 secondes.

Nota : Suivre les mesures de sécurité appropriées lors de l'utilisation du xylol.
--

7.4.4.9 Rincer les lames avec de l'eau froide du robinet; assécher à l'aide de papier buvard.

7.4.4.10 Submerger les lames avec de la safranine aqueuse 0,5 % pendant 30 secondes.

7.4.4.11 Rincer les lames avec de l'eau froide du robinet et laisser sécher en position verticale.

7.4.4.12 Les cellules végétatives de *B. cereus* se colorent en rouge et ont généralement une forme rectangulaire caractéristique, de 4 à 5 µ de long et de 1,0 à 1,5 µ de large avec des extrémités carrées et des coins arrondis et apparaissent habituellement réunies en chaînes. La couleur des spores varie de vert pâle à vert moyen et les globules lipidiques sont noirs. Les cellules végétatives présentant :
i) des spores centrales ou paracentrales ne gonflant pas distinctement le sporange et ii) des globules lipidiques, confirment que les isolats sont du genre *B. cereus*.

7.4.5 Calculs et rapports (Voir aussi le Tableau 2)

Sur la base des tests de confirmation pour chacun des deux types de culture, enregistrer la numération totale de *B. cereus* par g or ml d'aliment (N). Le nombre total de *B. cereus* par

g ou ml égale la somme du nombre de *B. cereus* de types 1 et 2 ($N_T=N_1+N_2$).

$$\text{Nbre de } B. cereus / \text{ type 1 par g ou ml (N)} = \frac{\text{Nbre de colonies confirmées comme étant } B. cereus (P)}{\text{Nombre de colonies testées (G)}} \times \text{Numération présumée de type 1 (C)}$$

Même calcul pour le type 2.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 AOAC. 2001. *Bacteriological Analytical Manual* (Online) Chapter 14, *Bacillus cereus*. USDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- 8.2 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.3 Harmon, S.M. 1982. New Method for Differentiating Members of the *Bacillus cereus* Group: Collaborative Study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **65**:1134-1139.
- 8.4 Santé Canada. 2003. *Compendium de méthodes*. http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment/mh-dm/mhe-dme/compendium/f_index.html
- 8.5 Holbrook, R. and Anderson, J.M., 1980. An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Can. J. Microbiol.* **26**: 753-759.

9. PRÉPARATION DES MILIEUX

9.1 Bouillon de sporulation

Glucose	50,0 g
Extrait de levure	30,0 g
Sulfate de manganèse (MnSO ₄)	3,0 g
Eau distillée	1,0 L

Ajouter les ingrédients à 1L d'eau distillée et amener à ébullition pour dissoudre. Transférer 100 ml dans des flacons Erlenmeyer de 500 ml. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

9.2 Gélose de mobilité BC (8.3)

Trypticase	10,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	2,5 g
Gélose	3,0 g
Eau distillée	1 L

Réchauffer pour dissoudre et mettre dans les tubes (recommandation : 2 ml dans des tubes de 13 X 100 mm). Stériliser pendant 10 minutes à 121 °C. pH final de 7,4 ± 0,2. Pour obtenir de meilleurs résultats, entreposer à la température ambiante pendant 2 à 4 jours avant utilisation afin d'empêcher la croissance le long des bords du milieu.

9.3 Colorant Fuchsine phétanée 0,5 % (8.3)

Fuchsine basique	0,5 g
Alcool	20 ml
Eau distillée	80 ml

Faire dissoudre 0,5 g de fuchsine basique dans 20 ml d'alcool et diluer à 100 ml avec de l'eau. Si nécessaire, filtrer la solution avec du papier fin pour retirer l'excès de particules de colorant. Entreposer dans un contenant fermé hermétiquement.

Nota : Le colorant à base de fuchsine est toxique et peut être cancérigène. Utiliser des mesures de sécurité appropriées.

TABLEAU 1

Préparation pour la première dilution

Type de produit alimentaire	Préparation	Traitement
Liquides	pipetter directement dans une boîte de Pétri et/ou un diluant à base d'eau peptonée	agiter
Liquides visqueux et non miscibles	peser dans un diluant à base d'eau peptonée	mélanger*
Solides		
Solides hydrosolubles	peser dans un diluant à base d'eau peptonée	agiter
Fromage	peser dans une solution stérile de 2 % de citrate de sodium ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) préchauffée à 45 °C	mélanger*
Épices	peser dans un diluant à base d'eau peptonée	agiter
Poudres, viandes et autres solides	peser dans un diluant à base d'eau peptonée	mélanger*

* Un stomacher peut aussi être utilisé pour le mélange initial.

TABLEAU II

Exemple de calcul de numération de *B. cereus* / *B. thuringiensis* par g ou ml d'aliment

Nombre total de colonies d'un des deux types sur les plaques en double « A »	Nombre d'isolats testés « G »	Nombre d'isolats confirmés comme <i>B. cereus</i> « P »	Nombre total de colonies d'un des deux types par g or ml « C » $C = 1/2AxD^* \times 5^{**}$	Nombre de <i>B. cereus</i> d'un des deux types par g or ml « N » $N = (P/G) \times C$
Moins de 5 (par ex. 4)	tous (4)	2	1000	500
Plus de 5 (par ex. 18)	5 (5)	4	4500	3600

Calculer N_1 et N_2 pour chaque type de colonie afin d'obtenir le nombre total de *B. cereus*.

(N_T) par g ou ml $N_T = N_1 + N_2$

p. ex. Si $N_1 = 1,000$ et $N_2 = 100$

$$N_T = 1,000 + 100 = 1\ 100/g$$

* Facteur de dilution = 100

** Pour les plaques en double, 0,2 ml par plaque (5.4.5). Diviser par 2 puisque « A » représente la numération totale des deux types sur les plaques en double.

Consigner le nombre total de *Bacillus cereus* / *Bacillus thuringiensis* par g or ml d'aliment à deux chiffres significatifs.

N.B.

Si les dix plaques de dilution sont comptées (7.3.3.2(a)); $C = B \times 10 \times 0,5$, où B est la numération totale d'un des deux types sur les dix plaques.

Si deux des dix plaques de dilution 1:10 sont comptées (7.3.3.2(b)); $C = 1/2Ax10 \times 5$