



DIRECTION GÉNÉRALE DE LA PROTECTION DE LA SANTÉ

OTTAWA

**DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES FÉCAUX DANS LES ALIMENTS AU MOYEN
DE LA MÉTHODE DE LA MEMBRANE FILTRANTE QUADRILLÉE
HYDROPHOBE (MFQH)**

**le Comité des méthodes microbiologiques
Division de l'évaluation
Bureau des dangers microbiens
Direction des aliments
Repère postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

Courriel: Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

La présente méthode peut servir au dénombrement des coliformes fécaux dans les aliments afin d'établir s'il y a conformité avec les articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Il a été démontré que cette méthode donne des résultats satisfaisants avec le poisson, la viande de volaille hachée, le poivre noir, le fromage et les noix (9.2). C'est en se fondant sur les résultats obtenus avec ces produits que l'Association of Official Analytical Chemists a donné à la méthode de la MFQH le statut de méthode finale officielle (9.1). Il n'y a aucune raison de croire que la méthode ne peut servir au dénombrement des coliformes fécaux dans d'autres aliments et ingrédients alimentaires. Cette version révisée remplace la méthode MFLP-55 de septembre 1993.

2. PRINCIPE

Le dénombrement des coliformes fécaux est fondé sur l'apparition de cultures bleues dans les mailles de la MFQH. Les cultures indiquent qu'il y a eu fermentation de lactose après incubation sur une gélose m-FC à 44,5 °C pendant 18-24 h. La méthode de la MFQH prend de 24 à 26 heures et donne des résultats aussi élevés mais moins aléatoires que la méthode du nombre le plus probable (8.3, 8.4). Une seule dilution permet de dénombrer les coliformes sur une vaste plage de niveaux de contamination. Le dénombrement peut être plus précis qu'avec des boîtes ou des membranes filtrantes classiques, car l'erreur attribuable à l'acuité visuelle individuelle est réduite (8.3). Lorsqu'on prévoit obtenir un faible dénombrement, on peut abaisser la limite de détection en filtrant une plus grande quantité de la suspension.

La méthode de la MFQH permet de détecter la présence de coliformes fécaux qui se reproduisent mal ou fermentent le lactose lentement dans des milieux LST ou BGLB (8.3). Au besoin, les organismes qui ont subi un stress peuvent être réactivés pendant 4 heures sur un milieu non sélectif avant d'être exposés à des conditions de croissance sélectives.

3. DÉFINITIONS

Voir l'annexe A du volume 3 (8.4).

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3 (8.4).

5. MATÉRIEL ET PRODUITS SPÉCIAUX

- 1) MFQH (1600 mailles, pores de 0,45 µm) ou l'équivalent. (Disponible chez Gleman Sciences, Montréal (Qué.).
- 2) Pincés pour membrane filtrante (disponibles chez Millipore Corp.).
- 3) Eau peptonée, 0,1 % (PEP) ou diluant peptone/Tween 80 (PT).
- 4) Boîtes de gélose trypticase soja au sulfate de magnésium (TSAM) s'il faut réactiver les micro-organismes.
- 5) Boîtes de gélose m-FC (Disponibles sur le marché; Difco Laboratories).
- 6) Solutions enzymatiques (annexe E du volume 3; 8.4) nécessaires pour certains produits alimentaires.
- 7) Appareil «Stomacher» Colworth ou l'équivalent.
- 8) Appareil de filtration carré (disponible chez Richard Brancker Research Ltd., 27, rue Monk, Ottawa (Ontario)), avec préfiltres d'embout de pipette (Filtaflex LH, Case postale 1224, Almonte (Ontario) ou Kalyx Biosciences Inc., 20, prom. Camelot, Nepean, (Ont.)), ou unité de filtration ISOGRID (Gelman Sciences).
- 9) Interprète HGMP (Modèle MI-200, Richard Brancker Research Ltd.) ou, pour le dénombrement manuel, Linecounter (Gelman Sciences).
- 10) Bain-marie pouvant maintenir une température de 35-37°C.
- 11) Incubateurs pouvant maintenir une température de 25°, 35° et 44,5°C ± 0,5°C.

6. MARCHE À SUIVRE

Analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement.
Procéder de la façon décrite ci-dessous :

6.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 6.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder les unités d'échantillonnage réfrigérées (0-5°C) ou congelées selon la nature du produit, sauf dans le cas des aliments qui se conservent à la température de la pièce. Décongeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur, ou pendant le temps et à la température nécessaires pour empêcher la croissance ou la mort des bactéries.
- 6.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage dès leur arrivée au laboratoire.

6.2 Préparation de l'analyse

- 6.2.1 Avoir à portée de la main de l'eau peptonée(PEP) stérile ou du diluant stérile peptone/Tween 80 (diluant PT), des plaques de gélose trypticase soja au sulfate de magnésium (TSAM) et de gélose m-FC, ainsi que les solutions enzymatiques requises pour la catégorie de produit alimentaire (Voir l'annexe E du volume 3; 9.5). L'eau peptonée suffit pour beaucoup d'aliments, mais si les aliments contiennent des quantités importants de gras (fromage et autres produits laitiers, bœuf haché, etc.), il faut utiliser le diluant PT pour les rendre plus filtrables. Utiliser le diluant PT avec l'appareil de filtration carré.
- 6.2.2 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié.
- 6.2.3 Marquer clairement les boîtes de Pétri utilisées en double en indiquant l'échantillon, l'unité d'échantillonnage, la dilution et la date d'ensemencement.

6.3 Préparation des dilutions

- 6.3.1 Pour s'assurer que l'unité d'analyse est vraiment représentative, il faut agiter les liquides ou les substances fluides jusqu'à homogénéité. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, constituer l'unité d'analyse en prélevant plusieurs spécimens à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.
- 6.3.2 Préparer une dilution 1:10 de l'aliment en ajoutant, dans des conditions aseptiques, 10 g ou ml (l'unité d'analyse) à 90 ml de PEP ou de diluant PT. S'il faut utiliser l'appareil de filtration carré pour ensemercer la MFQH, se servir du diluant PT. Il est préférable d'utiliser un appareil «Stomacher» pour mettre les organismes en suspension, car il réduit au minimum la quantité de débris alimentaires en suspension. Transférer une portion représentative de la dilution 1:10 pour produire les dilutions en série plus fortes nécessaires. Consulter l'annexe E du volume 3 afin de déterminer si le traitement enzymatique s'impose. Ce traitement n'est pas nécessaire pour les échantillons filtrés à une dilution de 1:100 ou plus.
 - 6.3.2.1 Mélanger au «Stomacher» pendant 1 minute.
 - 6.3.2.2 S'il faut mélanger la dilution 1:10 par agitation, agiter la bouteille de dilution 25 fois en effectuant des arcs de 30 cm pendant 7 secondes environ.
- 6.3.3 La filtration par la méthode de la MFQH élimine les acides ou d'autres inhibiteurs; il n'est donc pas nécessaire de vérifier le pH de la suspension et de l'ajuster.
- 6.3.4 La méthode de la MFQH permet d'effectuer des dénombrements à partir de suspensions renfermant jusqu'à 5 000 organismes/ml. Il n'est normalement pas nécessaire de préparer d'autres dilutions. S'il le faut, préparer au besoin des dilutions décimales successives en utilisant une pipette stérile différente pour chaque transfert. Consigner la dilution (C) utilisée pour l'analyse.
- 6.3.5 Lorsqu'on s'attend à une numération faible, il faut filtrer plus de 1,0 ml de la suspension. Filtrer le volume total disponible en une seule opération; ne pas essayer de filtrer des parts aliquotes successives de 1 ml. Consigner le volume (V) filtré.
- 6.3.6 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant d'effectuer les transferts de façon à distribuer uniformément les microorganismes présents.

6.4 Filtration

- 6.4.1 Agiter chaque sac de «Stomacher» ou bouteille à dilution pour remettre en suspension les matières qui pourraient s'y être déposées.
- 6.4.2 Manipuler la MFQH avec des pinces stériles.
- 6.4.3 Suivre les instructions du fabricant pour utiliser l'appareil de filtration. Prélever, dans des conditions

aseptiques, 1,0 ml de la dilution choisie et ensemercer une MFQH. Ouvrir le robinet du filtre, laisser tout le liquide s'écouler et enlever la MFQM dans des conditions aseptiques. Exécuter l'essai en double.

- 6.4.4 Répéter au besoin avec d'autres dilutions.
- 6.4.5 Suivre les instructions du fabricant pour le nettoyage de l'appareil.

6.5 Inoculation et incubation

- 6.5.1 Si la congélation ou un autre traitement ont pu affecter les microorganismes de l'échantillon, exécuter d'abord l'étape 6.5.2. Sinon, passer directement à l'étape 6.5.3.
- 6.5.2 Transférer la MFQH sur une boîte de Pétri de gélose TSAM en la roulant sur la gélose de façon à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les boîtes de Pétri à l'envers, en piles d'au plus trois, à 25 °C pendant 4 heures dans le cas des aliments secs et à 35 °C pendant 4 heures dans celui de tous les autres aliments.
- 6.5.3 Transférer la MFQH sur une boîte de Pétri de gélose m-FC en la roulant sur la gélose de façon à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les boîtes de Pétri à l'envers, en piles d'au plus deux, à $44,5 \pm 0,5$ °C pendant $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

6.6 Dénombrement et établissement de la valeur de la MFQH

- 6.6.1 Les colonies bleues à l'intérieur des mailles de la MFQH représentent des organismes qui fermentent le lactose et il faut les compter comme des coliformes fécaux.
- 6.6.2 Pour procéder à un dénombrement automatique, utiliser un interprète HGMF. Suivre les instructions du fabricant. Utiliser un Linecounter pour procéder à un dénombrement manuel.
- 6.6.3 La méthode de la MFQH donne des dénombrement précis sur une plage plus étendue qu'avec les boîtes de Pétri. Ne compter de préférence que les MFQH contenant de 20 à 1 580 mailles occupées. Traiter avec circonspection les résultats des MFQH contenant plus de 1 580 mailles occupées.
 - 6.6.3.1 Compter 1 (un) pour chaque maille présentant une coloration bleue. (NE PAS compter les colonies individuelles lorsqu'une maille renferme plus d'une colonie bleue.) Si une estimation grossière indique qu'il y a moins de 200 mailles occupées, compter toutes les mailles.
 - 6.6.3.2 Lorsque la densité des colonies est plus élevée (jusqu'à 50 % des mailles occupées), tourner la MFQH jusqu'à ce que l'indicateur de centre soit dirigé à gauche ou à droite. Compter les mailles positives (bleues) dans les 4 rangées situées immédiatement sous le centre et dans les 4 rangées situées immédiatement au-dessus du centre (8 rangées). Multiplier ce total partiel de la MFQH par 5 pour estimer la valeur de la MFQH, car on n'a compté que le cinquième de la MFQH.
 - 6.6.3.3 Lorsque la MFQH est tellement pleine qu'il semble plus facile de compter les mailles négatives (non bleues), on peut le faire en procédant comme en (6.6.3.1) et (6.6.3.2). Soustraire le total négatif de la MFQH de 1 600 ou 320, selon le cas. Multiplier par 5 pour obtenir la valeur de MFQH si l'on n'a compté que 1/5 de la MFQH.
 - 6.6.3.4 Lorsque toutes les mailles de la MFQH sont remplies de colonies bleues, indiquer que les colonies sont trop nombreuses pour être comptées (TNPC).
- 6.6.4 Consigner les valeurs de la MFQH des deux essais effectués en double. S'il n'y a aucune maille bleue, indiquer zéro pour la valeur de la MFQH.

6.7 Calcul du nombre le plus probable de coliformes fécaux

Voir l'annexe C du volume 3 (8.4).

7. RAPPORT DES RÉSULTATS

- 7.1 Noter le NPPUC moyen calculé au paragraphe 6.7 en arrondissant à deux chiffres significatifs près (p. ex., inscrire $2,9 \times 10^3$ pour 2 850).
- 7.2 Lorsque la dilution la plus faible ne produit aucune maille bleue dans la MFQH, la valeur à noter est la plus faible moyenne que l'on peut obtenir lorsqu'un volume donné est ensemencé sur un ensemble donné de MFQH en parallèle, précédée par le signe «moins de» (<). P. ex., pour 1,0 ml et un ensemble de MFQH en parallèle (1 ml par MFQH), la valeur est <0,5. Il faut multiplier ce chiffre par le facteur de dilution de l'inoculum sur la MFQH.

8. RÉFÉRENCES

- 8.1 AOAC, 1985, Official final action hydrophobic grid membrane filter method for detecting coliforms, fecal coliforms and *E. coli* in foods, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **68**:481.
- 8.2 Entis, P., 1984, Enumeration of total coliforms, fecal coliforms and *Escherichia coli* in foods by hydrophobic grid membrane filter: collaborative study, J. Assoc. Offic. Anal. Chem. **67**:812-823.
- 8.3 Sharpe, A.N. et P.I. Peterkin, 1988, Membrane filter food microbiology, Research Studies Press Ltd, Taunton, Somerset, R.U.
- 8.4 Annexes A, B, C et E, Vol. 3, Compendium de méthodes, Polyscience Publications Inc., Montréal (Québec).