



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES DANS LES ALIMENTS AU MOYEN  
DE LA GÉLOSE AU ROUGE VIOLET ET AUX SELS BILIAIRES (VRBA)

Patti Wilson  
Agence Canadienne d'Inspection des Aliments  
Laboratoire de Dartmouth, ACIA  
C.P. 1060  
Dartmouth, NS, B2Y 3Z7

Wilsonpa@em.agr.ca

**1. APPLICATION**

Cette méthode s'applique au dénombrement des coliformes dans les aliments et les ingrédients alimentaires pour déterminer s'il y a conformité avec les exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette méthode ne s'applique pas au dénombrement des coliformes dans les poissons, produits de poisson ou autres fruits de mer. Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-31 datée d'avril 1997.

**2. DESCRIPTION**

Il a été démontré que cette méthode a produit des résultats satisfaisants avec des aliments naturellement contaminés pour la détection des coliformes (8.2 -8.5).

**3. PRINCIPE**

La présence de coliformes dans un aliment peut indiquer qu'il a été transformé dans des conditions non hygiéniques. La présente procédure permet d'estimer le nombre de coliformes viables par g ou ml du produit. Une partie du produit est mélangée et incubée dans un milieu sélectif coulé en boîte de Pétri. Une sélection de colonies rouge-violet typiques sont soumises à des épreuves de confirmation. Le nombre de coliformes confirmés confirmée est calculé à partir du ratio entre le nombre de colonies confirmées et celui des colonies analysées.

**4. DÉFINITIONS**

Voir l'Annexe A du volume 2.

**5. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS**

Voir l'Annexe B du volume 2.

## 6. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

Les milieux suivants (1, 3 à 8) sont disponibles commercialement et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Voir également (8.1) et l'Annexe G du volume 2.

- 1) Diluant à l'eau peptonée (0,1 %)
- 2) Solution de citrate de sodium à 2 % (tempérée à 45°C) (pour les échantillons de fromage seulement)
- 3) Gélose nutritive (NA)
- 4) Gélose trypticase soja (TSA)
- 5) Gélose à l'éosine et au bleu de méthylène de Levine (L-EMB) ou gélose Endo
- 6) Bouillon lactosé au vert brillant et aux sels biliaires 2 % (BGLB)
- 7) Bouillon tryptosé au lauryl-sulfate (LST)
- 8) Gélose au rouge violet et aux sels biliaires (VRBA)
- 9) Gélose au rouge violet et aux sels biliaires, double concentration
- 10) Mélangeur, stomacher ou l'équivalent.
- 11) pH mètre ou papier pH capable de distinguer de 0,3 à 0,5 unité pH dans l'échelle de pH 5,0 à 8,0
- 12) HCL 1N et NaOH 1N
- 13) Réactifs pour coloration de Gram
- 14) Microscope optique
- 15) Cultures pour témoin positif et négatif, ATCC ou l'équivalent (voir le tableau II)
- 16) Incubateur capable de maintenir une température de 35°C.

**Note:** Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie soient 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 de 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. Une température plus élevée peut être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

- 17) Compteur de colonies (facultatif)

## 7. MARCHE À SUIVRE

On peut analyser chaque unité d'échantillonnage individuellement ou regrouper les unités d'analyse. L'analyse doit se faire conformément aux instructions suivantes :

### 7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Avant l'analyse au laboratoire, conserver les unités d'échantillonnage au réfrigérateur (0- 5 °C) ou au congélateur, à l'exception des aliments stables à la température de la pièce, selon la nature du produit. Faire décongeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou pendant une

période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.

7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage le plus tôt possible après leur réception au laboratoire.

## **7.2 Préparation pour l'analyse**

7.2.1 Avoir à sa disposition de l'eau peptonée stérile.

7.2.2 Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant approprié.

## **7.3 Préparation de l'échantillon**

7.3.1 Pour que l'unité d'analyse soit vraiment représentative, agiter les liquides ou les solides fluides jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas d'un solide, prélever des portions à différents endroits de l'unité d'échantillonnage. Pour réduire la charge de travail, on peut combiner les unités d'analyse. Il est recommandé qu'une unité composée ne contienne pas plus de 500 g.

7.3.2 Préparer une dilution 1:10 de l'aliment en mélangeant de façon aseptique 25 g ou ml (l'unité d'analyse) à 225 ml du diluant requis, de la façon indiquée dans le tableau I. Si la taille ou le volume de l'échantillon diffère de 25 g ou ml, il faut maintenir à 1:10 le ratio échantillon:dilution, tel que 11 (10) g ou ml dans 99 (90) ml.

<b>Note :</b> Le poids ou le volume entre parenthèses indique une autre façon de préparer les dilutions.
----------------------------------------------------------------------------------------------------------

7.3.3 Dans le cas des produits qu'il faut mélanger, utiliser le mélangeur ou le «stomacher» pendant le temps minimal nécessaire pour produire une suspension homogène. Pour éviter de surchauffer l'échantillon, ne pas mélanger pendant plus de 2,5 minutes. Agiter les dilutions à 25 reprises en suivant un arc de 30 cm pendant environ 7 secondes.

7.3.4 Laisser l'homogénat (dilution 1:10) d'aliments secs reposer à la température de la pièce pendant 15 minutes. Dans tous les autres cas, poursuivre l'analyse sans tarder.

7.3.5 Vérifier le pH de la suspension d'aliments. Si le pH ne se situe pas entre 5,5 et 7,6, il faut l'ajuster à 7,0 en ajoutant du NaOH 1N ou du HCl 1N stérile.

7.3.6 Dans le cas des aliments qui ont tendance à mousser, régler le mélangeur à basse vitesse et prélever une part aliquote sous l'interface liquide/mousse.

7.3.7 Préparer des dilutions décimales successives au besoin en utilisant une pipette stérile pour effectuer chaque transfert.

7.3.8 Agiter toutes les dilutions de la façon décrite en 7.3.3 immédiatement avant d'effectuer les transferts afin d'assurer l'uniformité de la distribution des micro-organismes présents.

## **7.4 Dénombrement des coliformes présumés**

### **7.4.1 Marche à suivre pour les aliments non transformés**

7.4.1.1 Pipetter 1 ml des dilutions nécessaires dans chaque boîte de Pétri stérile en double.

7.4.1.2 Verser dans chaque boîte de Pétri environ 10 ml de gélose au rouge violet et aux sels biliaires (VRBA) et mélanger en faisant tourner doucement. Laisser solidifier sur une surface au niveau.

7.4.1.3 Ajouter une couche d'environ 5 ml de VRBA et laisser solidifier ; ceci aide à prévenir la croissance de surface et la formation de colonies envahissantes.

7.4.1.4 Incuber les boîtes à l'envers à 35 °C pendant 24 ± 2 h.

#### **7.4.2 Marche à suivre pour les aliments réfrigérés, congelés et transformés**

7.4.2.1 Pipetter 1 ml des dilutions requises dans chacune des boîtes de Pétri stériles en double.

7.4.2.2 Verser dans chaque boîte environ 10 ml de gélose trypticase soja (TSA), mélanger en faisant tourner doucement et laisser solidifier sur une surface au niveau.

7.4.2.3 Incuber les boîtes à la température de la pièce pendant 2 ± 0,5 h.

7.4.2.4 Ajouter 5 ml ou un quantité pour former une couche mince et uniforme de gélose VRBA à double concentration et laisser solidifier.

7.4.2.5 Incuber les boîtes à l'envers à 35 °C pendant 24 ± 2 h.

#### **7.5 Dénombrement de coliformes confirmés**

7.5.1 Dénombrer les boîtes qui contiennent de 20 à 200 colonies rouge violacé d'environ 0,5 mm ou plus de diamètre et qui sont entourées d'une zone rougeâtre de sels biliaires précipités.

7.5.2 Prélever un nombre représentatif de colonies de chaque type morphologique et transférer chaque colonie dans un tube de bouillon lactosé au vert brillant et aux sels biliaires 2% (BGLB). Au besoin, purifier les colonies sur la gélose VRBA.

7.5.3 Incuber les tubes de bouillon BLGB ensemencés à 35 °C pendant 24 ± 2 h. Vérifier s'il y a production de gaz et consigner les résultats.

7.5.4 Incuber les tubes qui ne contiennent pas de gaz pendant 24 ± 2 h de plus, vérifier de nouveau, consigner le nombre de tubes supplémentaires qui contiennent du gaz et ajouter au résultat obtenu en 7.5.3.

7.5.5 La formation de gaz durant la période d'incubation de 48 ± 4 h constitue une épreuve positive confirmée. Procéder à une coloration de Gram de tout tube avec une pellicule pour exclure les bacilles Gram positifs qui fermentent le lactose.

7.5.6 Calculer le nombre de coliformes par g(ml) d'aliment dans chacune des boîtes en double en multipliant le pourcentage de tubes de BGLB confirmés positifs par le compte obtenu dans la gélose VRBA en 7.5.1 et par le facteur de dilution. Rapporter la moyenne des boîtes en double.

Si le plus petit nombre de colonies par boîte dépasse 200, compter ou estimer le nombre et consigner le résultat suivi de la lettre E (estimation) : p. ex., 1,8 x 10<sup>6</sup> E, pour indiquer une précision moindre. Si le nombre est trop élevé pour être estimé, inscrire le nombre minimum estimable précédé d'un signe > : par exemple, >2,0 x 10<sup>6</sup>.

Si le nombre le plus élevé de colonies par boîte est inférieur à 20, inscrire le résultat suivi de la lettre E : p. ex., 1,2 x 10<sup>3</sup> E. Si l'on ne trouve aucune colonie présumée, inscrire le compte en indiquant <0,5 multiplié par le facteur de dilution.

#### **7.6 Analyse supplémentaire pour épreuve complète (facultative)**

7.6.1 S'il est nécessaire d'effectuer une épreuve complète pour confirmer la présence de coliformes, il faut analyser tous les tubes de bouillon BGLB positif dès que le résultat positif est consigné.

7.6.2 Agiter doucement les tubes de bouillon BGLB positif et, à partir de chaque tube, ensemencer les boîtes de gélose L-EMB ou Endo de façon à obtenir des colonies bien isolées. Incuber les boîtes à 35 °C pendant 24 ± 2 h.

- 7.6.3 Examiner les boîtes. Les coliformes typiques produisent des colonies qui peuvent être nucléées avec ou sans reflet métallique ou elles peuvent être opaques, mucoïdes ou roses. Tous les autres types ne font pas partie du groupe des coliformes.
- 7.6.4 Choisir, de préférence à l'aide d'un stéréoscope ou autre appareil de grossissement, deux colonies typiques de coliformes dans chaque boîte. S'il n'y a pas de colonies typiques, choisir deux colonies jugées les plus susceptibles d'appartenir au groupe des coliformes. Choisir des colonies isolées. Lorsque aucune colonie bien isolée n'est visible, il faut purifier les colonies en les ensemençant de nouveau sur une gélose sélective fraîche (7.6.2).
- 7.6.5 Ensemencer les colonies choisies sur des géloses nutritives (NA) et dans des tubes de bouillon tryptosé au lauryl-sulfate (LST) frais.
- 7.6.6 Incuber les géloses NAensemencées à 35 °C pendant 24 ± 2 h ou 48 ± 4h.
- 7.6.7 Incuber les bouillons LSTensemencés à 35 °C pendant 24 ± 2 h. Vérifier s'il y a production de gaz et consigner les résultats.
- 7.6.8 Incuber les tubes où il ne se forme pas de gaz pendant 24 ± 2 h de plus, examiner de nouveau, et ajouter le nombre de tubes supplémentaires où il se forme du gaz au résultat obtenu en 7.6.7.
- 7.6.9 S'il se forme du gaz dans un tube contenant du bouillon LST après 24 ± 2 h ou 48 ± 4 h, procéder à une coloration de Gram à partir de la culture de gélose nutritive correspondante. Examiner au microscope afin de déterminer la morphologie cellulaire et la réaction de Gram. Noter les résultats.
- 7.6.10 La formation de gaz dans un tube de bouillon LST et la présence, sur la culture de gélose, de bactéries non sporulées, Gram négatives et en forme de bâtonnets constituent une épreuve complète positive de la présence de coliformes.
- 7.6.11 Si les deux isolats ne produisent pas de gaz dans le bouillon LST ou ne sont pas des bactéries non sporulées, Gram négatives et en forme de bâtonnets, on peut considérer qu'il n'y a pas de coliformes dans le tube de bouillon BGLB original.
- 7.6.12 Calculer le nombre de coliformes par g(ml) d'aliments pour chacune des boîtes de Pétri en double en multipliant le pourcentage de tubes BGLB positifs confirmés par le compte obtenu dans la gélose VRBA en 7.5.1 et par le facteur de dilution. Indiquer les moyennes des boîtes de Pétri en double.

## 8. RÉFÉRENCES

- 8.1 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiological Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 8.2 American Public Health Association (APHA). 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Third Edition. C. Vanderzant and D.F. Splittstoesser (eds.). American Public Health Association Inc.
- 8.3 International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1978. *Microorganisms in Foods; Their Significance and Method of Enumeration*. Second edition. University of Toronto Press.
- 8.4 ICMSF. 1980. *Microbial Ecology of Foods; Factors Affecting Life and Death of Microorganisms*. Academic Press.
- 8.5 Food and Drug Administration. 1995. *Bacteriological Analytical Manual*. Eighth edition. AOAC International, Gaithersburg, MD.

**TABLEAU I. Préparation de la dilution initiale**

Type de produit alimentaire	Préparation	Traitement
<u>Liquides</u> :		
lait, eau, etc.	pipetter directement dans le diluant à l'eau peptonée	agiter
liquides visqueux	peser et ajouter le diluant à l'eau peptonée	agiter
<u>Solides</u> :		
solides hydrosolubles	peser et ajouter le diluant à l'eau peptonée	agiter
poudre, viandes	peser et ajouter le diluant à l'eau peptonée	mélanger au mélangeur ou au «stomacher»
fromages (tous)	peser et ajouter une solution aqueuse de citrate de sodium ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) à 2 % préchauffée (45 °C)	mélanger au mélangeur ou au «stomacher»
épices	peser et ajouter le diluant à l'eau peptonée	agiter ou mélanger au «stomacher»

**TABLEAU II Micro-organismes pour le contrôle de la qualité**

Milieu	Organisme positif	Organisme négatif
VRBA	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Salmonella enteritidis</i>
TSA	<i>Staphylococcus aureus</i>	non ensemencé
BGLB	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
L-EMB	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	non ensemencé
Gélose Endo	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
NA	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	non ensemencé
LST	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Utiliser les souches de micro-organismes indiquées ici ou celles qui donnent la même réaction.

1. *Escherichia coli* ATCC 25922
2. *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048
3. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
4. *Salmonella enteritidis* ATCC 13076