



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

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

P.I. Peterkin, A.N. Sharpe et H. Wang
Bureau de dangers microbiens
Direction générale des produits de santé et des aliments
Repère postal : 2204A2
Ottawa (Ontario), K1A 0L2

E-mail: Haiyan_Wang@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

La méthode peut être utilisée pour déterminer le nombre de coliformes fécaux dans les aliments afin d'établir s'il y a conformité avec les exigences des articles 4 et 7 de la Loi sur les aliments et drogues. Cette version révisée remplace la méthode MFHPB-17 datée d'avril 1997.

2. DESCRIPTION

Il a été démontré que cette méthode produit des résultats satisfaisants avec la viande hachée, la viande froide, les aliments séchés, le fromage, les aliments congelés (9.3), et avec le lait écrémé en poudre, la crème anglaise à la vanille en conserve, le poisson, la volaille, les noix et le poivre (9.4). D'après les résultats obtenus sur ces derniers produits, l'Association of Official Analytical Chemists considère comme «Official Final Action» la méthode MFQH (9.1). Il n'y aucune raison de croire que la méthode ne peut être utilisée avec succès pour le dénombrement des coliformes dans d'autres aliments et ingrédients alimentaires.

3. PRINCIPE

L'analyse au moyen de la MFQH prend de 24 à 26 heures et donne des résultats aussi élevés et plus précis que la méthode du Nombre le Plus Probable (9.4). Une seule dilution donne des résultats exacts pour une plage étendue de niveaux de contamination. La précision du dénombrement peut être meilleure avec la MFQH qu'avec des géloses conventionnelles ou les membranes filtrantes classiques, car la MFQH diminue l'effet de l'acuité visuelle individuelle sur le dénombrement (9.5). Lorsqu'on prévoit une faible numération, on peut abaisser la limite de détection en filtrant une plus grande quantité de la suspension.

La méthode MFQH permet de détecter les coliformes dont la croissance est lente ou qui fermentent lentement le lactose dans les milieux LST ou BGLB (9.4). Au besoin, les organismes qui ont subi un stress devraient être ravivés en les cultivant pendant quatre heures sur un milieu non sélectif avant de

les exposer à des conditions de croissance sélective.

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 listés ci-dessous (items 3-5) sont disponibles commercialement et doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant :

- 1) MFQH (1600 mailles, pores de 0,45 µm ; disponible sous le nom de membranes filtrantes ISO-GRID chez Oxoid Ltd, Nepean, Ontario) ou l'équivalent
- 2) Pincettes à membrane filtrante
- 3) Eau peptonée 0,1 % (EP) ou diluant Peptone/Tween 80 (PT) (si un appareil de filtration est utilisé)
- 4) Boîtes de gélose nutritive (GN), si l'on doit raviver les organismes
- 5) Boîtes de gélose m-FC (sans acide rosolique)
- 6) Solutions enzymatiques (Annexe E du volume 2; 9.6) requises pour certaines catégories de produits alimentaires
- 7) Mélangeur Stomacher ou l'équivalent
- 8) Sacs à Stomacher (disponibles commercialement) avec un filtre intérieur ou des embouts de pipette comme pré filtre (Filtaflex Ltd., Almonte, Ont.)
- 9) Appareil de filtration avec entonnoir (Filtaflex) ou unité de filtration ISO-GRID (Oxoid) ou l'équivalent
- 10) Incubateurs pouvant 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.

Optionnel

- 11) Compteur de colonies manuel ou automatique

7. MARCHE À SUIVRE

Analyser individuellement chaque unité d'échantillonnage.
Effectuer l'analyse conformément aux instructions suivantes :

7.1 Manipulation des unités d'échantillonnage

- 7.1.1 Au laboratoire, avant l'analyse, garder les unités d'échantillonnage réfrigérées (0 à 5 °C) ou congelées, selon la nature du produit, sauf pour les aliments stables à la température de la pièce. Dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des bactéries.
- 7.1.2 Analyser les unités d'échantillonnage aussitôt que possible après leur arrivée au laboratoire.

7.2 Préparation pour l'analyse

- 7.2.1 Avoir à portée de la main du diluant stérile à l'eau peptonée (EP) ou du diluant peptone/tween 80 (PT), des boîtes de gélose nutritive (GN) (si nécessaire), des boîtes de gélose m-FC et, au besoin, les solutions enzymatiques requises selon la catégorie de produits alimentaires (voir l'Annexe E du volume 2). Utiliser le diluant PT lorsqu'on utilise un appareil de filtration.
- 7.2.2 Nettoyer la surface de travail au moyen d'un désinfectant approprié.
- 7.2.3 Marquer clairement les boîtes de Pétri utilisées en double en y indiquant l'échantillon, l'unité d'échantillonnage, la dilution et la date d'ensemencement.

7.3 Préparation des dilutions

- 7.3.1 Pour s'assurer que l'unité d'analyse est vraiment représentative, agiter les liquides ou les substances fluides jusqu'à homogénéité. Si l'unité d'échantillonnage est un solide, constituer l'unité d'analyse en faisant plusieurs prélèvements à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.
- 7.3.2 Préparer une dilution de 1:10 de l'aliment en ajoutant, dans des conditions aseptiques, 10 g ou ml (l'unité d'analyse) à 90 ml du diluant EP ou PT. Si un appareil de filtration est utilisé pour ensemencer la MFQH, utiliser du diluant PT. Il est préférable d'utiliser un mélangeur «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 faire les dilutions en série au besoin. Consulter l'Annexe E du volume 2 pour voir si un traitement enzymatique est requis. Un tel traitement n'est pas nécessaire dans le cas des échantillons filtrés à une dilution 1:100 ou plus.
 - 7.3.2.1 Mélanger au «Stomacher» pendant une minute. On empêche la formation de mousse dans le «Stomacher» en glissant le sac sur le bord des parois de l'appareil de façon à chasser tout l'air.
 - 7.3.2.2 S'il faut mélanger la dilution 1:10 en l'agitant, agiter la bouteille de dilution 25 fois en effectuant un arc de 30 cm pendant environ 7 secondes.
- 7.3.3 La filtration par la méthode MFQH élimine les acides ou autres inhibiteurs. Il n'est pas nécessaire de vérifier et d'ajuster le pH de la suspension.
- 7.3.4 La méthode MFQH permet d'effectuer des numérations à partir de suspensions renfermant jusqu'à 5 000 organismes/ml. Il n'est habituellement pas nécessaire de préparer d'autres dilutions. Au besoin, préparer des dilutions décimales successives en utilisant une pipette stérile différente pour chaque transfert. Consigner la dilution (C) utilisée pour l'analyse.

- 7.3.5 Lorsqu'on s'attend à une numération faible, filtrer plus de 1,0 ml de la suspension. Filtrer le volume total qui doit être filtré en une seule opération. Ne pas tenter de filtrer des portions successives de 1 ml. Consigner le volume (V) filtré.
- 7.3.6 Agiter toutes les dilutions immédiatement avant de faire les transferts de façon à distribuer uniformément les micro-organismes présents.

7.4 Filtration

- 7.4.1 Agiter chaque sac «Stomacher» ou bouteille de dilution pour remettre en suspension les matières qui pourraient s'y être déposées.
- 7.4.2 Manipuler la MFQH avec des pinces stériles.
- 7.4.3 Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation de l'appareil de filtration et/ou des embouts de pipette comme pré filtre. Pipetter aseptiquement 1,0 ml de la dilution requise et ensemercer la MFQH. Ouvrir le robinet de l'appareil de filtration, laisser tout le liquide s'écouler et retirer aseptiquement la MFQH. Faire l'analyse en duplicata.
- 7.4.4 Suivre les instructions du fabricant pour le nettoyage de l'appareil de filtration.
- 7.4.5 Répéter au besoin avec d'autres dilutions.

7.5 Inoculation et incubation

- 7.5.1 Lorsque les organismes dans l'échantillon risquent d'avoir subi un stress causé par une congélation ou tout autre traitement, il faut commencer par l'étape 7.5.2. Sinon, passer directement à l'étape 7.5.3.
- 7.5.2 Transférer la MFQH sur la surface d'une boîte de gélose nutritive en la roulant sur la gélose de manière à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les boîtes à l'envers à 35 °C pendant 4 h. en évitant d'en empiler plus de deux.
- 7.5.3 Transférer la MFQH à la surface d'une boîte de gélose m-FC en la roulant sur la gélose de manière à ne pas emprisonner de bulles d'air. Incuber les boîtes à l'envers, à 35 °C pendant 24 ± 2 h en évitant d'en empiler plus de deux.

7.6 Numération et établissement de la valeur de la MFQH

- 7.6.1 Les colonies bleues dans les mailles de la MFQH sont des organismes fermentant le lactose et sont dénombrées comme des bactéries coliformes.
- 7.6.2 Suivre les instructions du fabricant pour l'utilisation du compteur de colonies manuel ou automatique .
- 7.6.3 La méthode MFQH donne des numérations précises dans une gamme plus étendue que ne le permettent les boîtes de Pétri. Compter uniquement les MFQH contenant de 20 à 1 580 mailles occupées (9.5).
 - 7.6.3.1 Compter 1(un) pour chaque maille présentant une coloration bleue. (NE PAS compter les colonies individuelles lorsqu'une maille contient plus d'une colonie bleue.) Si une estimation sommaire indique qu'il y a moins de 200 mailles occupées, compter toute la MFQH.
 - 7.6.3.2 Lorsque la densité des colonies est plus élevée (soit 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 le résultat de la numération partielle par 5 pour estimer la valeur de la MFQH.

7.6.3.3 Lorsque la MFQH est tellement remplie qu'il semble plus facile de compter les mailles négatives (non bleues), procéder de la même façon qu'en 7.6.3.1 et 7.6.3.2. Soustraire le compte négatif de la MFQH de 1 600 ou 320, selon qu'on a compté toute la MFQH ou seulement un cinquième. Multiplier par 5 pour obtenir la valeur de la MFQH si l'on n'a compté que le cinquième de la MFQH.

7.6.3.4 Lorsque toutes les mailles de la MFQH sont remplies de colonies bleues, noter que les colonies sont trop nombreuses pour être comptées (TNTC).

7.6.4 Noter les valeurs de la MFQH des deux essais en double. S'il n'y a aucune maille de couleur bleue, indiquer zéro pour la valeur de la MFQH.

7.7 Calcul du nombre le plus probable de coliformes

Voir l'Annexe C du volume 2 (9.6).

8. RÉSULTATS

8.1 Indiquer le NPPUC moyen calculé en 7.7 en arrondissant à deux chiffres significatifs (p. ex., indiquer $2,9 \times 10^3$ pour 2 850).

8.2 Lorsque la dilution la plus faible ne donne aucune maille bleue dans la MFQH, la valeur à indiquer est la moyenne la plus faible que l'on peut obtenir pour un ensemble de plaques lorsqu'un volume donné estensemencé, précédée par le signe « moins de » (<) : exemple, pour 1,0 ml et deux essais MFQH effectués en double (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.

9. RÉFÉRENCES

- 9.1 Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 1985. Official final action hydrophobic grid membrane filter method for detecting total coliforms, fecal coliforms and *E. coli* in foods. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. **68**:481.
- 9.2 Atlas, R.M. 1997. *Handbook of Microbiology Media*. Second edition. L.C. Parks (editor). CRC Press Inc.
- 9.3 Brodsky, M.H., P. Entis, A.N. Sharpe et G.A. Jarvis. 1982. Enumeration of indicator organisms in foods using the automated hydrophobic grid-membrane filter technique. J. Food Prot. **45**: 292-296.
- 9.4 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.
- 9.5 Sharpe, A.N. et P.I. Peterkin. 1988. *Membrane filter food microbiology*. Research Studies Press Ltd., Taunton, Somerset, U.K.
- 9.6 Santé Canada. 1993 Annexes A, B, C et E, vol. 2, Compendium des méthodes d'analyse, <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.

10. PRÉPARATION DES MILIEUX

Lorsqu'on utilise la stérilisation à la vapeur, il est essentiel d'allouer un temps suffisant pour que la charge atteigne la température requise avant que la stérilisation proprement dite débute. Cette période varie selon la nature et la taille de la charge. On doit donc respecter les temps d'exposition pour s'assurer de la stérilité des solutions en flacons et des milieux de culture thermostables. Se référer au mode d'emploi du stérilisateur.

10.1 Gélose m-FC (sans acide rosolique)

Tryptose	10,0 g
Peptone de protéose n° 3	5,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Lactose	12,5 g
Sels biliaires n° 3	1,5 g
NaCl	5,0 g
Bleu d'aniline	0,1 g
Gélose	15,0 g
Eau distillée	1 000 ml

La gélose m-FC est disponible commercialement (c.-à-d. base de gélose m-FC, Difco 0677). Chauffer le mélange jusqu'à ébullition, tempérer à 50-55 °C et ajuster le pH à $7,4 \pm 0,1$. Verser de 15 à 20 ml par boîte de Pétri sur une surface plane. Les boîtes de gélose se gardent 4 semaines à 4 °C

10.2 Gélose nutritive (GN)

Extrait de boeuf (Bacto ou l'équivalent)	3 g
Peptone (Bacto ou l'équivalent)	5 g
Gélose	15 g
Eau distillée	1 000 ml

Ajouter les ingrédients à 1 litre d'eau distillée, porter à ébullition pour dissoudre complètement et laisser refroidir à 50-60 °C; ajuster le pH de façon à obtenir une valeur de 6,8 à 7,0 après stérilisation. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes et verser de 15 à 20 ml de gélose dans des boîtes de Pétri sur une surface plane. Les boîtes de Pétri se gardent 8 semaines à 4 °C. La gélose nutritive est disponible commercialement.

10.3 Diluant Peptone/Tween 80 (PT)

Peptone	1,0 g
Tween 80 (mono-oléate de polyoxyéthylène sorbitane)	10,0 g
Eau distillée	1 000 ml

Dissoudre les ingrédients dans de l'eau distillée chaude. Répartir en quantités suffisantes dans des contenants munis de bouchons qui vissent pour obtenir 90 ml après le passage à l'autoclave. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

10.4 Diluant à l'eau peptonée (0.1%)

Peptone	1.0g
Eau distillée	1000 ml

Dissoudre les ingrédients dans l'eau distillée et compléter le volume à 1 litre. Répartir en quantités suffisantes dans des contenants munis de bouchons qui vissent pour donner 90 ml après le passage à l'autoclave. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

