

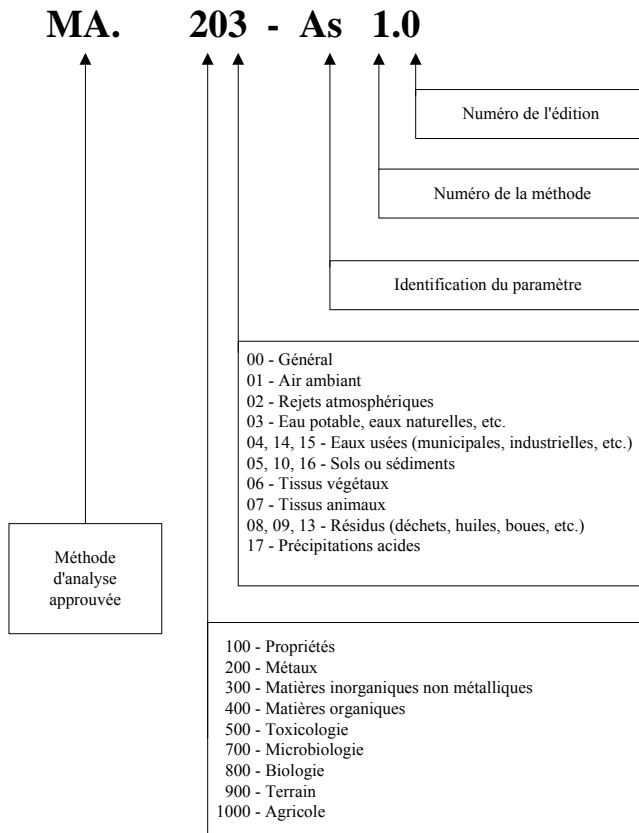
# Méthode d'analyse



## MA. 700 – Sal-PA 1.0

Recherche des salmonelles : méthode présence/absence

## Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est marquée de l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. Il peut également être élevé si une révision entraîne des modifications en profondeur de la méthode. La date de révision est suivie d'un chiffre qui indique le numéro de la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC.  
*Recherche des salmonelles : méthode présence/absence*, MA. 700 – Sal-PA 1.0, Rév. 3,  
Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs du  
Québec, 2013, 25 p.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec  
2700, rue Einstein, bureau E.2.220  
Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-1301  
Télécopieur : 418 528-1091  
Courriel : ceaeq@mddefp.gouv.qc.ca

© Gouvernement du Québec, 2013

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	4
INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	6
2. PRINCIPE ET THÉORIE	6
3. FIABILITÉ	7
3.1. Interférence	7
3.2. Limite de détection	8
3.3. Récupération	8
3.4. Réplicabilité	8
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	8
5. APPAREILLAGE	9
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	10
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	14
7.1. Préparation de l'échantillon et des contrôles de qualité	15
7.2. Enrichissement non sélectif	19
7.3. Sélection	19
7.4. Isolement	20
7.5. Confirmation	20
8. EXPRESSION DES RÉSULTATS	21
8.1. Échantillons solides	21
8.2. Échantillons liquides	21
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	21
10. BIBLIOGRAPHIE	21
ANNEXE	23

## **LISTE DES FIGURES**

- Figure 1 – Croissance sur le milieu sélectif MRSV. A) Apparence typique des salmonelles.  
B) Apparence grumeleuse d'une croissance non salmonelles (agrandie). 23
- Figure 2 – Variation du seuil de détection analytique de la présente méthode en fonction de la  
siccité de l'échantillon pour cinq prises d'essai. 24
- Figure 3 – Étapes de l'analyse des échantillons solides. 25

## INTRODUCTION

Les salmonelles sont des bactéries entériques en forme de bâtonnets, anaérobies facultatives, à Gram négatif, mobiles pour la plupart avec des flagelles péritriches, de  $0,7-1,5 \times 2,0-2,5 \mu\text{m}$ , qui produisent du sulfure d'hydrogène. La nomenclature des salmonelles est particulièrement complexe. La notion d'espèce est peu employée pour le genre *Salmonella* et on réfère plutôt au sérotype. Ce genre contient plus de 2 000 sérotypes différents.

Les salmonelles peuvent se trouver dans les sols et les eaux, et dans plusieurs résidus. Le genre *Salmonella* contient plusieurs sérotypes pathogènes pour l'humain et les animaux. Les animaux domestiques et sauvages sont des réservoirs des salmonelles. Les humains également agissent comme réservoir lorsqu'ils sont en convalescence ou lorsqu'ils sont victimes d'une infection asymptomatique. Des porteurs chroniques se trouvent parmi les oiseaux et les animaux, mais rarement parmi les humains.

La transmission des infections à salmonelles se fait principalement par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Plusieurs sérotypes de *Salmonella* sont largement distribués dans la nature et associés aux matières fécales des animaux. La consommation de viande et de poulet contaminés constitue la principale source d'infection pour l'humain. La dose-infection peut être faible, soit de l'ordre de 15 à 20 cellules.

La première édition de l'actuel *Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes* (MDDEP 2012) avait été publiée en 2004 et elle contenait un critère pour les salmonelles. Ainsi, pour faire partie de la catégorie P1, les biosolides (boues) d'origine industrielle ou municipale, les composts et les autres matières résiduelles fertilisantes devaient être exempts de salmonelles à un seuil de détection inférieur à 3 NPP/4 g (base sèche)<sup>1</sup>. Un premier addenda au *Guide*, publié en février 2006, est venu modifier ce critère. Il se lisait alors ainsi : « Salmonelles non détectées (dans 50 g humides) ». Un second addenda a été publié en janvier 2007. Le nouveau critère se lisait alors « Salmonelles non détectées dans 10 g humides, pour les résidus ayant une siccité  $\geq 15\%$  (ou dans 50 g humides pour les autres résidus) ». Ce critère a été maintenu dans l'édition 2012 du *Guide* et il est toujours en vigueur.

Le Règlement sur la qualité de l'eau potable contient aussi une norme qui peut s'appliquer aux salmonelles (Gouvernement du Québec, 2001). On y indique que « L'eau prélevée à des fins d'analyse microbiologique doit être exempte d'organismes pathogènes... ». Cet article du Règlement inclut implicitement les salmonelles, qui sont considérées comme des microorganismes pathogènes; cependant, il n'exige pas leur contrôle régulier.

Cette méthode a été élaborée et validée dans les laboratoires du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec. Elle a été conçue, en collaboration avec la Direction des politiques du milieu terrestre, afin de simplifier la recherche des salmonelles dans les matières résiduelles et de diminuer le coût de l'analyse par rapport à la méthode utilisant la technique des tubes multiples (MA.700 – Sal-tm 1.0). Bien que cette méthode-ci soit de type présence/absence, les milieux de culture employés pour l'enrichissement et la sélection sont les mêmes que ceux

---

<sup>1</sup> < 3 NPP/4 g (b. s.) signifie « plus petit que trois salmonelles (quantité déterminée par la technique du Nombre le Plus Probable dans quatre grammes de l'échantillon (exprimé sur une base sèche, après avoir déterminé la siccité de l'échantillon)).

préconisés par la méthode USEPA 1682 (USEPA, 2006), qui se veut aussi une méthode de dénombrement par tubes multiples.

## 1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode présence/absence permet de détecter des salmonelles mobiles dans les matières résiduelles fertilisantes, les composts, les fumiers et l'eau.

## 2. PRINCIPE ET THÉORIE

### Préparation des échantillons

Les échantillons solides sont pesés de manière aseptique et mis en suspension (2-10 % P/V) dans le bouillon d'enrichissement non sélectif TSB. Les échantillons solides sont homogénéisés avec le bouillon TSB dans un mélangeur afin d'augmenter la récupération des salmonelles. Le volume des échantillons liquides très chargés en matières en suspension est mesuré à l'aide d'un cylindre gradué et l'échantillon est déposé dans le bouillon TSB. Les échantillons liquides peu chargés sont filtrés sur une ou plusieurs membranes de 0,45 µm pour concentrer les bactéries. Les membranes sont déposées dans le bouillon TSB.

### Enrichissement non sélectif

Le bouillon d'enrichissement non sélectif TSB est incubé pendant 24 h à 36 °C. L'enrichissement permet la croissance et la multiplication de toutes les bactéries capables de croître dans le bouillon TSB.

### Sélection

Six gouttes du milieu d'enrichissement non sélectif sont déposées sur la gélose semi-solide MSR/V (milieu modifié semi-solide de Rappaport-Vassiliadis). Chaque goutte doit pénétrer dans la gélose sans être étalée. Cette gélose est incubée pendant 16-48 h à 42 °C en position non inversée. Lors de l'incubation, les salmonelles, en raison de leur mobilité, forment un halo de croissance qui s'éloigne du point d'inoculation (voir photo en annexe). Au terme de l'incubation, la croissance à l'extrémité du halo ne contient généralement que des salmonelles.

Le milieu MSR/V contient des peptones comme source de carbone et d'azote pour permettre la croissance. Le chlorure de magnésium sert à augmenter la pression osmotique. La novobiocine et le vert de malachite inhibent la croissance des microorganismes qui ne sont pas des salmonelles.

Le pH acide du milieu en association avec la novobiocine, le vert de malachite et le chlorure de magnésium de même que la température élevée d'incubation et l'utilisation de la mobilité des salmonelles permettent de sélectionner les souches de *Salmonella*.

### Isolement

Un peu de croissance est prélevée à l'extrémité du halo dans la gélose MSR/V et striée sur le milieu gélosé XLT4, qui est incubé à 36 °C pendant 24 h. Les colonies noires sur la gélose XLT4

sont présumées appartenir au genre *Salmonella*. Le sulfure d'hydrogène formé par ces bactéries réagit avec les ions ferriques contenus dans le milieu XLT4 pour former un précipité noir.

La gélose XLT4 contient des peptones comme source d'azote. De l'extrait de levure sert de source de vitamines et d'autres cofacteurs. La différenciation des salmonelles sur ce milieu est basée sur la fermentation du xylose, du lactose et du sucrose de même que sur la décarboxylation de la lysine et la production de sulfure d'hydrogène. Cette dernière est mise en évidence à l'aide de fer ferrique contenu dans le milieu. Le thiosulfate de sodium sert de source de soufre inorganique. Le chlorure de sodium maintient la pression osmotique du milieu. Le rouge de phénol agit comme indicateur de pH permettant de mettre en évidence les réactions de fermentation et de décarboxylation. Le Tergitol® 4 inhibe la croissance des bactéries qui ne sont pas des salmonelles.

### Confirmation

Les colonies présumées être des salmonelles sur le milieu XLT4 sont vérifiées à l'aide d'un système biochimique d'identification. Une seule identification positive est nécessaire pour déclarer un échantillon positif pour la présence de salmonelles.

### Seuil de détection de la méthode

Cette méthode est conçue pour permettre de démontrer l'absence de salmonelles dans un échantillon avec un seuil de détection inférieur à 3 salmonelles/4 g (base sèche).

En se basant sur l'hypothèse que cette méthode permet de détecter une cellule viable de salmonelles dans une prise d'essai de 10 g (base humide) d'échantillon, il a été calculé à l'aide de l'équation 1 que l'absence de salmonelles pouvait être démontrée dans tous les échantillons humides ayant une siccité supérieure à 13,3 % de matières sèches avec un seuil de détection de < 3 salmonelles/4 g (base sèche). La figure 2 (en annexe) illustre la variation du seuil de détection de la méthode en fonction de la siccité de l'échantillon pour plusieurs prises d'essai.

Équation 1

$$\text{Seuil de détection (1 salmonelle/4 g b.s.)} = \frac{1 \text{ salmonelle}}{\text{prise d'essai (g b.h.)}} \times \frac{100}{\text{matières sèches (\%)}} \times 4$$

## **3. FIABILITÉ**

### 3.1. INTERFÉRENCE

Certains échantillons peuvent faire diminuer ou augmenter le pH du milieu d'enrichissement TSB et ainsi interférer avec la croissance des salmonelles. Il importe de s'assurer que le pH du bouillon TSB est adéquat après avoir homogénéisé l'échantillon.

Des composés contenus dans certains échantillons peuvent interférer avec la croissance des salmonelles et faire en sorte que de faux résultats négatifs soient obtenus, d'où l'importance d'effectuer des contrôles de matrice.

Les autres microorganismes contenus dans certains échantillons peuvent interférer avec la détection des salmonelles. L'analyse d'un contrôle de matrice permet de vérifier cette éventualité.

La mobilité des salmonelles dans le milieu gélosé MSR/V peut être diminuée lorsque le milieu est trop sec. Il importe d'éviter la dessiccation de ce milieu lors de son entreposage et de son incubation.

Les boîtes du milieu MSR/V doivent être mises en incubation dans un délai maximal de 30 minutes après la filtration car la température d'incubation est un facteur important de sélectivité de la méthode.

### 3.2. LIMITE DE DÉTECTION

La capacité de la méthode à détecter une quantité voisine d'une seule cellule viable de salmonelle dans un échantillon de boues d'usine de pâtes et papiers a été démontrée expérimentalement (Cantin *et al.*, 2007). Lors de cet essai, des prises d'essai de 10 g d'échantillon ont été enrichies dans 500 ml de bouillon TSB.

### 3.3. RÉCUPÉRATION

Une validation réalisée à l'été 2005 dans le laboratoire du CEAEQ a permis d'analyser huit échantillons de provenances variées à l'aide du protocole décrit dans cette méthode. Pour chaque échantillon, un duplicata dopé avec une suspension de salmonelles (entre 20 et 100 UFC) à l'étape de l'homogénéisation au mélangeur a été analysé. Comme il était attendu, des salmonelles ont été détectées dans tous les échantillons dopés.

### 3.4. RÉPLICABILITÉ

Cinq répliqués d'un échantillon de biosolide papetier (pH 6,5, 29,6 % de matières sèches) ont été analysés le même jour par le même analyste avec le protocole décrit dans cette méthode. Tous les répliqués ont donné un résultat négatif pour la présence des salmonelles. Cinq répliqués d'un échantillon de boues d'abattoir de volaille (pH 5,2, 7,9 % de matières sèches) ont été analysés dans les mêmes conditions de répliquabilité et tous les résultats ont été positifs.

## 4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

Pour tout échantillonnage il faut employer une technique aseptique.

Pour les échantillons solides prélevés conformément au *Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes*, suivre les instructions du *Protocole d'échantillonnage de matières résiduelles fertilisantes* (DR-12-MRF-01-01, CEAEQ).

Les autres échantillons solides peuvent être prélevés dans un sac tel que décrit ci-dessus, dans un sac Whirl-Pak<sup>®</sup> ou dans une bouteille en polypropylène stérile à large ouverture fournie par le laboratoire. Un poids d'environ 150 g est requis pour l'analyse des salmonelles et la réalisation d'un contrôle de matrice.



Prélever les échantillons liquides (eaux usées, eau de surface et eau potable soupçonnées d'être contaminées) dans une bouteille de polypropylène stérile fournie par le laboratoire. Laisser un espace d'environ 3 cm entre la surface du liquide et le bouchon de la bouteille afin de permettre une bonne agitation au laboratoire. Des volumes minimaux de 50 ml, 1 litre et 4 litres sont requis pour l'analyse respective des eaux usées, de l'eau de surface et de l'eau potable, mais il est préférable de prélever au moins deux fois ce volume pour permettre le contrôle de la qualité des analyses en laboratoire.

De plus, les bouteilles utilisées pour le prélèvement d'eau potentiellement chlorée doivent contenir une solution de thiosulfate de sodium  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  dont la concentration finale est de 100 mg/litre dans l'échantillon. Le thiosulfate agit comme agent neutralisant du chlore résiduel, qui pourrait être présent dans l'eau.

Conserver tous les échantillons à une température d'environ 4 °C, sans les congeler. Le délai entre le prélèvement et le début de l'analyse ne doit pas dépasser 48 h mais il est préférable de débiter l'analyse le plus rapidement possible après le prélèvement.

Il est recommandé de transmettre les échantillons au laboratoire le plus rapidement possible. Les échantillons qui ne peuvent pas être analysés dans les 4 heures suivant leur arrivée au laboratoire doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse.

## 5. APPAREILLAGE

- 5.1. Plateau stérile en acier inoxydable
- 5.2. Spatule stérile en acier inoxydable
- 5.3. Cylindres gradués stériles
- 5.4. Brûleur Bunsen ou brûleur à alcool
- 5.5. Balance analytique avec une précision de 0,1 g
- 5.6. Plateau à pesée
- 5.7. Mélangeur (*blender*) et récipient stérile (autoclavable)
- 5.8. Pipette stérile de 50,0 ml de type TD
- 5.9. Stérilisateur à rayons ultraviolets
- 5.10. Rampe de filtration avec entonnoirs et supports de filtre
- 5.11. Flacons laveurs pour l'eau de rinçage
- 5.12. Pompe à vide
- 5.13. Pincettes en acier inoxydable à bout plat

- 5.14. Membranes filtrantes stériles quadrillées de porosité de 0,45 µm et de 47 mm de diamètre
- 5.15. Bouteilles de 150 ml avec bouchon vissé
- 5.16. Incubateur ajusté à  $36 \pm 1,5$  °C
- 5.17. Micropipette (pour un volume de 30 µl)
- 5.18. Embouts ouatés (pour un volume de 30 µl)
- 5.19. Boîtes de Pétri stériles de 15 mm × 100 mm
- 5.20. Incubateur ajusté à  $42 \pm 0,5$  °C
- 5.21. Fil à boucle
- 5.22. Tubes à essais de 16 mm × 125 mm
- 5.23. pH-mètre
- 5.24. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.25. Réfrigérateur maintenant une température entre 2 et 6 °C
- 5.26. Autoclave

## **6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS**

Tous les réactifs commerciaux employés sont de qualité ACS, à moins d'une indication contraire. L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture et des réactifs est de l'eau distillée, déminéralisée ou ultrapure. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

- 6.1. Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS n° 1310-73-2)

Solution commerciale 10 N

- 6.2. Solution d'hydroxyde de sodium 1 N

Ajouter 100 ml de la solution commerciale de NaOH 10 N dans environ 700 ml d'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à température ambiante.

- 6.3. Acide chlorhydrique, HCl (CAS n° 7647-01-0)

Solution commerciale 1 N

- 6.4. Phosphate de potassium,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (CAS n° 7778-77-0)

6.5. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhydre (cf. 6.4) dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N (cf. 6.2) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.6. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.5) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de polypropylène ou encore des flacons laveurs et autoclaver à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau tamponnée de rinçage se conserve deux mois à 4 °C.

6.7. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.5) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de  $90 \pm 2$  ml après une stérilisation à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

6.8. Souche de *Salmonella* Typhimurium

6.9. Bandelettes pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase *Pathotec*<sup>®</sup> *cytochrome oxydase*, *Remel Lenexa*, *KS*

6.10. Galerie d'identification biochimique *Microscan*<sup>®</sup> *Gram negative*

6.11. Bouillon trypticase soja (TSB)

Digestion pancréatique de caséine	17,0 g
Digestion papaïque de germes de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate dipotassique	2,5 g
Dextrose	2,5 g
Eau	1 litre

Dans une fiole erlenmeyer de 2 000 ml, peser 30,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de  $7,3 \pm 0,2$  à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.3) ou de NaOH 1 N (cf. 6.2). Répartir dans des bouteilles en verre stériles. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

Ce milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant 4 à 6 semaines.

6.12. Supplément sélectif MSR/V (Oxoid SR0181E)

Novobiocin 10 mg/flacon, 20 mg/litre dans le milieu reconstitué.

#### 6.13. Gélose modifiée semi-solide de Rappaport Vassiliadis (MSRV) (Oxoid CM0910)

Tryptose	4,59 g
Hydrolysate de caséine (acide)	4,59 g
Chlorure de sodium	7,34 g
Phosphate de potassium monobasique	1,47 g
Chlorure de magnésium anhydre	10,93 g
Vert de malachite oxalate	0,037 g
Agar	2,7 g
Eau	1 litre

Pour préparer 500 ml de milieu, dissoudre 15,8 g dans 500 ml d'eau. Porter doucement à ébullition en mélangeant fréquemment. NE PAS AUTOCLAVER. Refroidir à 50 °C et ajouter stérilement le contenu d'un flacon de supplément sélectif MSRV (cf. 6.12) reconstitué avec 2 ml d'eau stérile. Bien mélanger et répartir en volumes d'environ 25 ml dans des boîtes de Pétri (cf. 5.19). Le pH doit être de  $5,4 \pm 0,2$  à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.3) ou de NaOH 1 N (cf. 6.2). Ne pas inverser les boîtes de Pétri lors de l'entreposage. Deux modes de conservation peuvent être employés pour ce milieu. 1) Il peut être conservé dans un contenant étanche pour une durée maximum de deux semaines au réfrigérateur et à l'abri de la lumière ou 2) il peut être conservé à la température ambiante pendant  $\leq 48$  heures. CE MILIEU EST TRÈS HYGROSCOPIQUE.

**NOTE 1 – Irritant pour les yeux, les voies respiratoires et la peau. En cas de contact avec les yeux, laver immédiatement et abondamment avec de l'eau et consulter un spécialiste.**

**NOTE 2 – Les géloses MSRV doivent être assez épaisses – un volume d'environ 25 ml de milieu de culture est requis par boîte de Pétri – pour éviter la dessiccation pendant l'incubation, ce qui pourrait limiter la mobilité des salmonelles.**

**NOTE 3 – L'humidité élevée de ce milieu favorise la mobilité des salmonelles. Il est important de respecter les modes de conservation pour éviter sa déshydratation.**

#### 6.14. Gélose XLT4

Peptone n° 3	1,6 g
Extrait de levure	3 g
L-Lysine	5 g
Xylose	3,75 g
Lactose	7,5 g
Saccharose	7,5 g
Citrate d'ammonium ferrique	0,8 g
Thiosulfate de sodium	6,8 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	18 g
Phénol rouge	0,08 g
Eau	1 litre

Suspendre 59,0 g de milieu déshydraté dans 1 000 ml d'eau, ajouter 4,6 ml de supplément pour agar XLT4 et chauffer jusqu'à ébullition pour dissoudre complètement. Éviter de surchauffer. Ne pas autoclaver. Le pH final doit être à  $7,4 \pm 0,2$ . Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (*cf.* 6.3) ou de NaOH 1 N (*cf.* 6.2). Répartir dans des boîtes de Pétri de 100 x 15 mm et laisser solidifier. Les boîtes de Pétri se conservent deux semaines à 4 °C. Le milieu de base XLT4 et le supplément sont disponibles dans le commerce.

#### 6.15. Gélose infusion cœur-cervelle

Infusion cœur-cervelle (matières solides)	8,0 g
Digestion peptique de tissu animal	5,0 g
Digestion pancréatique de caséine	16,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Dextrose	2,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Agar	13,5 g

Peser 52,0 g de milieu déshydraté dans un flacon erlenmeyer de 2 000 ml et le dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Chauffer le milieu au point d'ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Répartir en volumes d'environ 8,5 ml dans des tubes de 16 x 125 mm. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes et refroidir les tubes de façon à obtenir des géloses inclinées. Le pH doit être de  $7,4 \pm 0,2$  à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (*cf.* 6.3) ou de NaOH 1 N (*cf.* 6.2). Les tubes se conservent quatre semaines à 4 °C. Ce milieu est disponible dans le commerce.

#### 6.16. Gélose de soja Trypticase (TSA)

Digestion pancréatique de caséine	15,0 g
Digestion papaïque de farine de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15 g

Dans un flacon erlenmeyer de 2 000 ml, peser 40,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Chauffer le milieu au point d'ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Répartir dans des boîtes de Pétri. Le pH doit être de  $7,3 \pm 0,2$  à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (*cf.* 6.3) ou de NaOH 1 N (*cf.* 6.2). Ce milieu de culture se conserve pendant un mois à 4 °C. Ce milieu de culture est disponible dans le commerce.

#### 6.17. Bouillon infusion cœur-cervelle

Infusion cœur-cervelle (matières solides)	6,0 g
Digestion peptique de tissu animal	6,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g

Dextrose	3,0 g
Digestion pancréatique de gélatine	14,5 g
Phosphate disodique	2,5 g

Peser 37,0 g de milieu déshydraté dans un flacon erlenmeyer de 2 000 ml et le dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Chauffer le milieu au point d'ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Répartir en volumes de 50 ml dans des bouteilles de verre. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH doit être de  $7,4 \pm 0,2$  à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.3) ou de NaOH 1 N (cf. 6.2). Le bouillon se conserve pendant 4 à 6 semaines à 4 °C. Ce milieu est disponible dans le commerce.

#### 6.18. Suspension de salmonelles

Inoculer un volume de 30 ml de bouillon infusion cœur-cervelle (cf. 6.17) avec une souche de salmonelles (cf. 6.7) et incuber à 35 °C pendant 18-24 heures.

Diluer la culture obtenue dans de l'eau tamponnée stérile (cf. 6.6). Inoculer les contrôles positifs et les contrôles de matrice avec un volume approprié d'une dilution permettant l'addition de 20 à 100 UFC de la souche de salmonelles.

Il est recommandé d'effectuer un dénombrement en triplicata par la technique de la membrane filtrante avec la gélose TSA (cf. 6.16) de 0,1 ml de la culture diluée (à environ  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$ ) pour s'assurer que les contrôles ont été inoculés avec 20 à 100 UFC de salmonelles. Incuber les géloses à  $36 \pm 1,5$  °C pendant 24 heures.

Il est aussi recommandé de constituer un historique des dénombrements de la suspension de salmonelles afin d'être en mesure de connaître le volume et la dilution à employer pour inoculer les contrôles avec 20 à 100 UFC de salmonelles.

## 7. PROTOCOLE D'ANALYSE

Pour toute série d'échantillons, les recommandations des *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, DR-12-SCA-02, sont suivies et tous les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité nécessaires sont réalisés en conformité à ces lignes directrices.

Il est recommandé que tous les entonnoirs et supports de filtre soient lavés et stérilisés aux rayons ultraviolets après toute série d'analyses et toute interruption de travail supérieure à 15 minutes. La stérilisation aux rayons ultraviolets est obligatoire avant l'analyse de chaque échantillon d'eau.

## 7.1. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON ET DES CONTRÔLES DE QUALITÉ

### 7.1.1. Échantillons solides (biosolide, matière résiduelle quelconque, fumier, sol, etc.)

- Étaler la totalité de l'échantillon dans un plateau en acier inoxydable stérile (cf. 5.1). L'usage d'une hotte est recommandé pour les matières fortement odorantes.
- À l'aide de spatules stériles (cf. 5.2) ou, si nécessaire, de gants chirurgicaux désinfectés avec de l'alcool, défaire les amas le plus possible et mélanger de manière à homogénéiser l'échantillon.
- Utiliser une spatule ou une pince stérilisée par flambage à l'alcool pour prélever des petites quantités de l'échantillon en divers endroits de celui-ci et ainsi obtenir une prise d'essai représentative de la totalité de l'échantillon. Les particules solides qui sont relativement petites doivent faire partie de l'échantillon analysé, mais pas les plus gros morceaux tels que les copeaux de bois.
- Analyser au moins 10 g de l'échantillon humide. Pour les matières résiduelles fertilisantes, se référer aux critères du *Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes (MDDEP, 2012)* pour connaître la quantité d'échantillon à analyser. Pour les échantillons qui ne sont pas concernés par ce guide, l'analyse d'une quantité de 50 g d'échantillon humide est recommandée.
- De manière aseptique, peser la quantité requise d'échantillon et l'incorporer dans le récipient stérile d'un mélangeur (cf. 5.7).
- Additionner d'abord la moitié du volume de bouillon TSB (cf. 6.11) requis pour l'enrichissement (Tableau 1).

Tableau 1 – Volume final de bouillon TSB requis pour l'enrichissement en fonction de la quantité d'échantillon analysé

Quantité d'échantillon analysé	Volume de bouillon TSB requis pour l'enrichissement
10 g	200 ml
50 g	450 ml

- Agiter le mélange pendant 1 minute à la plus petite vitesse du mélangeur. L'agitation peut produire beaucoup de mousse dans le contenant du mélangeur.
- Ajouter ensuite le reste du volume requis de bouillon TSB (cf. 6.11) au mélange ou employer le reste du bouillon TSB (cf. 6.11) pour rincer le contenant du mélangeur lorsque le mélange est transféré dans un autre contenant pour la période d'incubation (cf. 7.2). Agiter la suspension manuellement avant l'incubation.

#### 7.1.1.1. Vérification et ajustement du pH

- Le pH de l'échantillon homogénéisé dans le bouillon TSB doit être vérifié à l'aide d'une technique aseptique et il doit être compris entre 6,0 et 7,5.
- Si nécessaire, ajuster le pH de l'homogénat avec une solution de HCl 1 N (*cf.* 6.3) ou de NaOH 1 N (*cf.* 6.2) de manière aseptique.

#### 7.1.1.2. Blanc de méthode

- L'analyse d'un blanc de méthode est requise pour chaque série d'analyses.
- Additionner 200 ou 450 ml de bouillon d'enrichissement TSB (*cf.* 6.11) (selon le volume requis indiqué au tableau 1) dans le récipient stérile d'un mélangeur (*cf.* 5.7) Ne rien ajouter de plus.
- Agiter pendant 1 minute à la plus petite vitesse du mélangeur.
- Effectuer les étapes 7.2 et 7.3 du protocole d'analyse.

#### 7.1.1.3. Contrôle positif

- L'analyse d'un contrôle positif est recommandée mais non obligatoire pour chaque série d'analyses.
- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles (*cf.* 6.18) à 200 ou 450 ml de bouillon d'enrichissement TSB (*cf.* 6.11) selon le volume requis (tableau 1).
- Agiter pendant 1 minute à la plus petite vitesse du mélangeur.
- Effectuer ensuite les étapes 7.2 à 7.4 du protocole d'analyse.

#### 7.1.1.4. Contrôle de matrice

- L'analyse d'un contrôle de matrice (ou échantillon dopé) est obligatoire pour chaque échantillon solide, à moins que le laboratoire ne soit en mesure de démontrer que l'échantillon provient d'un même endroit et a subi le même traitement d'hygiénisation qu'un échantillon précédemment analysé pour lequel un contrôle de matrice a déjà été analysé. Dans le cas où des échantillons provenant d'une même source sont régulièrement analysés, l'analyse d'un contrôle de matrice doit être faite pour 10 % des échantillons.
- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles (*cf.* 6.18) à un double de l'échantillon homogénéisé dans le bouillon d'enrichissement TSB (*cf.* 6.11).
- Agiter pendant 1 minute à la plus petite vitesse du mélangeur.



- Effectuer ensuite les étapes 7.2 à 7.4 du protocole d'analyse.

#### 7.1.2. Échantillons liquides très chargés (lisier, eau usée, etc.)

- Bien homogénéiser l'échantillon en l'agitant d'un mouvement vertical vigoureux environ 25 fois. Mesurer 50,0 ml de l'échantillon dans un cylindre gradué stérile (*cf.* 5.3) et l'incorporer dans 450 ml de bouillon d'enrichissement TSB (*cf.* 6.11). Homogénéiser en agitant le contenant manuellement.

##### 7.1.2.1. Vérification et ajustement du pH

- Le pH de l'échantillon homogénéisé dans le bouillon TSB doit être vérifié à l'aide d'une technique aseptique et il doit être compris entre 6,0 et 7,5.
- Si nécessaire, ajuster le pH de l'homogénat avec une solution de HCl 1 N (*cf.* 6.3) ou de NaOH 1 N (*cf.* 6.2) de manière aseptique.

##### 7.1.2.2. Blanc de méthode

- L'analyse d'un blanc de méthode est requise pour chaque série d'analyses.
- Mesurer 50,0 ml d'eau stérile à l'aide d'un cylindre gradué et l'incorporer à 450 ml bouillon d'enrichissement TSB (*cf.* 6.11). Ne rien ajouter de plus.
- Effectuer les étapes 7.2 et 7.3 du protocole d'analyse.

##### 7.1.2.3. Contrôle positif

- L'analyse d'un contrôle positif est recommandée mais non obligatoire pour chaque série d'analyses.
- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles (*cf.* 6.18) à 450 ml de bouillon d'enrichissement TSB (*cf.* 6.11). Homogénéiser en agitant le contenant manuellement.
- Effectuer ensuite les étapes 7.2 à 7.4 du protocole d'analyse.

##### 7.1.2.4. Contrôle de matrice

- L'analyse d'un contrôle de matrice est obligatoire pour chaque échantillon, à moins que le laboratoire ne soit en mesure de démontrer que l'échantillon provient d'un même endroit et a subi le même traitement d'hygiénisation qu'un échantillon précédemment analysé pour lequel un contrôle de matrice a déjà été analysé. Dans le cas où des échantillons provenant d'une même source sont régulièrement analysés, l'analyse d'un contrôle de matrice doit être faite pour 10 % des échantillons.

- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles (*cf.* 6.18) à un double de l'échantillon homogénéisé dans le bouillon d'enrichissement TSB (*cf.* 6.11). Homogénéiser en agitant le contenant manuellement.
- Effectuer ensuite les étapes 7.2 à 7.4 du protocole d'analyse.

### 7.1.3. Échantillons liquides (eau potable, eau de surface, etc.)

- Stériliser les entonnoirs et les supports à filtre dans le stérilisateur à rayons ultraviolets pendant 2 minutes.
- Mettre les supports et les entonnoirs sur la rampe de filtration.
- Mettre en fonction l'appareil à vide.
- Prendre une membrane filtrante stérile près du bord à l'aide d'une pincette stérilisée par flambage à l'alcool et la déposer ensuite sur le support de filtre.
- Placer l'entonnoir sur le support et le fixer fermement.
- Verser le volume requis de l'échantillon dans l'entonnoir. Il est recommandé d'analyser un volume de 1 litre pour les échantillons d'eau de surface et de 4 litres pour les échantillons d'eau potable.
- Faire le vide pour filtrer l'échantillon.
- Pendant la filtration, remplir continuellement l'entonnoir jusqu'à filtration totale de l'échantillon (de 1 litre à 4 litres) ou jusqu'au colmatage de la membrane filtrante.
- Lorsque la membrane se colmate, changer de membrane filtrante. Utiliser autant de membranes filtrantes que nécessaire.
- Une fois tout le volume de l'échantillon filtré, rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage stérile (utiliser un flacon laveur).
- À l'aide d'une pincette stérilisée par flambage à l'alcool, déposer la ou les membranes filtrantes dans une bouteille contenant 75 ml de bouillon d'enrichissement TSB (*cf.* 6.11).

#### 7.1.3.1. Blanc de méthode

- L'analyse d'un blanc de méthode est requise pour chaque série d'analyses.
- Avant de filtrer le premier échantillon, rincer la paroi intérieure de l'entonnoir avec 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage (*cf.* 6.6).

- Déposer la membrane filtrante dans 75 ml de bouillon TSB et effectuer les étapes 7.2 et 7.3 du protocole d'analyse.

#### 7.1.3.2. Contrôle positif

- L'analyse d'un contrôle positif ou d'un contrôle de matrice est obligatoire pour chaque série d'analyses.
- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles (cf. 6.18) à au moins 250 ml d'eau stérile.
- Filtrer sur une membrane filtrante.
- Effectuer ensuite les étapes 7.2 à 7.4 du protocole d'analyse.

#### 7.1.3.3. Contrôle de matrice

- L'analyse d'un contrôle positif ou d'un contrôle de matrice est obligatoire pour chaque série d'analyses.
- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles (cf. 6.18) à un double de l'échantillon.
- Effectuer ensuite les étapes 7.2 à 7.4 du protocole d'analyse.

### 7.2. ENRICHISSEMENT NON SÉLECTIF

- Incuber les bouillons d'enrichissement (cf. 7.1) à  $36 \pm 1,5$  °C pendant  $24 \pm 2$  heures.
- Les échantillons homogénéisés au mélangeur peuvent être incubés directement dans le contenant du mélangeur ou transférés avant l'incubation dans des bouteilles stériles.

### 7.3. SÉLECTION

Sans les étaler, déposer six gouttes de 30 µl séparées sur une gélose MSR/V (cf. 6.13) pour chaque bouillon d'enrichissement. Répartir les gouttes sur la surface de la gélose (voir figure 1 en annexe). Ne pas étaler; laisser les gouttes s'absorber dans la gélose en conservant la gélose à l'endroit pendant environ une heure à la température ambiante.

**NOTE 1 – Le degré d'humidité de la gélose MSR/V peut influencer la distance de migration des salmonelles. Il est important de ne pas assécher ce milieu de culture.**

- Incuber les boîtes de Pétri à  $42 \pm 0,5$ °C pendant 16-48 heures dans un incubateur à air chaud et à humidité contrôlée. **Ne pas incuber les boîtes de Pétri à l'envers.** *Si aucun incubateur à humidité contrôlée n'est disponible, un contenant d'eau ouvert placé dans le fond de l'incubateur permet de maintenir une humidité suffisante pendant l'incubation.*

Au terme de la période d'incubation, examiner les boîtes et rechercher un halo blanchâtre de croissance qui s'éloigne d'environ 1 à 2 cm du point d'inoculation (exemple à la figure 1). Cela indique la présence possible de salmonelles mobiles.

- Il faut attendre 48 h d'incubation sur la gélose MSRV pour déclarer l'absence de salmonelles dans un échantillon en raison de l'absence de halo blanchâtre de croissance. On peut poursuivre l'analyse à l'étape 7.4 pour les échantillons qui présentent un halo de croissance après 16 h d'incubation sur la gélose MSRV.

**NOTE 2 – La migration des salmonelles dans les contrôles positifs et les contrôles de matrice est souvent plus rapide que celle des salmonelles dans les échantillons. Il est donc important de respecter la durée d'incubation de 48 h avant de déclarer l'absence de salmonelle dans un échantillon.**

#### 7.4. ISOLEMENT

- À l'aide d'un fil à boucle, prélever de la croissance à l'extrémité extérieure du halo sur le milieu MSRV et étaler cette croissance sur le milieu XLT4 (cf. 6.14) afin d'obtenir des colonies isolées. La croissance des salmonelles se fait à l'intérieur de la gélose MSRV. En conséquence, le fil à boucle doit être enfoncé légèrement dans la gélose pour réussir le repiquage de la croissance. Lorsque c'est possible, repiquer la croissance provenant d'au moins deux gouttes sur autant de géloses XLT4.
- Incuber les géloses XLT4 à  $36 \pm 1,5^\circ$  C pendant  $24 \pm 2$  heures.
- Après la période d'incubation, observer et noter les résultats.
- Sur XLT4, les colonies caractéristiques des salmonelles sont entièrement noires, roses avec centre noir, jaunes avec centre noir ou plus rarement, rose seulement. Les autres espèces forment généralement des colonies jaunes sans centre noir. Il s'agit d'une identification présomptive.

#### 7.5. CONFIRMATION

- Repiquer les colonies caractéristiques des salmonelles obtenues sur le milieu XLT4 sur des géloses infusion cœur-cerveau (BHI) (cf. 6.15). Incuber à  $36 \pm 1,5^\circ$  C pendant 18-24 heures.
- Effectuer la détection de l'activité cytochrome-oxydase en faisant un frottis de chaque colonie (à partir de la croissance obtenue sur BHI) sur une bandelette (cf. 6.9). Les salmonelles sont oxydase négative. Se référer aux instructions du fabricant des bandelettes.
- Identifier les colonies caractéristiques de salmonelles (cf. 7.4) et oxydase négative à l'aide de galeries biochimiques d'identification Microscan<sup>®</sup> (cf. 6.10). Se référer aux instructions du fabricant des galeries.

- La détection d’au moins une colonie caractéristique des salmonelles sur XLT4, oxydase négative et appartenant au genre *Salmonella* constitue une présence de salmonelles. Autrement, il s’agit d’une absence de salmonelles.
- On peut également obtenir le sérotypage ou le typage moléculaire des isolats de salmonelles lorsque cela est requis. S’adresser à un laboratoire de référence sur les salmonelles.

## 8. EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 8.1. ÉCHANTILLONS SOLIDES

- Rappporter la présence ou l’absence de salmonelles par rapport à la quantité d’échantillon analysée (en grammes, base humide) sur le certificat d’analyse. Par exemple, « ABSENCE/10 g (base humide) ».

### 8.2. ÉCHANTILLONS LIQUIDES

- Rappporter la présence ou l’absence de salmonelles par rapport au volume total d’échantillon analysé.

## 9. CRITÈRES D’ACCEPTABILITÉ

- Il n’y a pas de croissance caractéristique sur la gélose MSR/V à partir du blanc de méthode effectué au moment de l’analyse.
- Il n’y a pas de croissance sur les témoins de stérilité de la gélose XLT4 préparée au moment de l’analyse.
- Des colonies caractéristiques des salmonelles sont obtenues sur la gélose XLT4 préparée à partir du contrôle positif, du contrôle de matrice, ou des deux contrôles.
- Toutes les exigences applicables précisées dans les *Lignes directrices pour l’application des contrôles de la qualité en microbiologie* (DR-12-SCA-02) sont respectées.

## 10. BIBLIOGRAPHIE

CANTIN, P.V., S. BENOIT et M.H. HÉBERT. *Towards a new methodology and new criteria for the use of Salmonella as a single bacterial indicator of the quality of biosolids, compost and other fertilizing residuals*, accepté pour publication à la conférence Moving Forward Wastewater Biosolids Sustainability: Technical, Managerial, and Public Synergy, organisée par l’International Water Association, Moncton Canada, juin 2007.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, DR-12-SCA-02, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Édition courante.

[[http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/PALA/DR12SCA02\\_lignes\\_dir\\_micro.pdf](http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/PALA/DR12SCA02_lignes_dir_micro.pdf)]

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Protocole d'échantillonnage de matières résiduelles fertilisantes – Fabriques de pâtes et papiers*, DR-12-MRF-01-01, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Édition courante. (<http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/paee/protocole-mrf.pdf>)

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. *Règlement sur la qualité l'eau potable*, Gazette officielle du Québec, Partie 2, Lois et règlements, 1<sup>er</sup> mai 2011. [<http://www.mddep.gouv.qc.ca/eau/potable/brochure/index.htm>]

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, DE L'ENVIRONNEMENT ET DES PARCS. *Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes : Critères de référence et normes réglementaires*, ISBN 978-2-550-64355-5, 2012.

([http://www.mddep.gouv.qc.ca/matieres/mat\\_res/fertilisantes/critere/index.htm](http://www.mddep.gouv.qc.ca/matieres/mat_res/fertilisantes/critere/index.htm))

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium*, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 2006. (<http://epa.gov/waterscience/methods/biosolids/EPA.Method.1682.July2006.pdf>)

**ANNEXE**

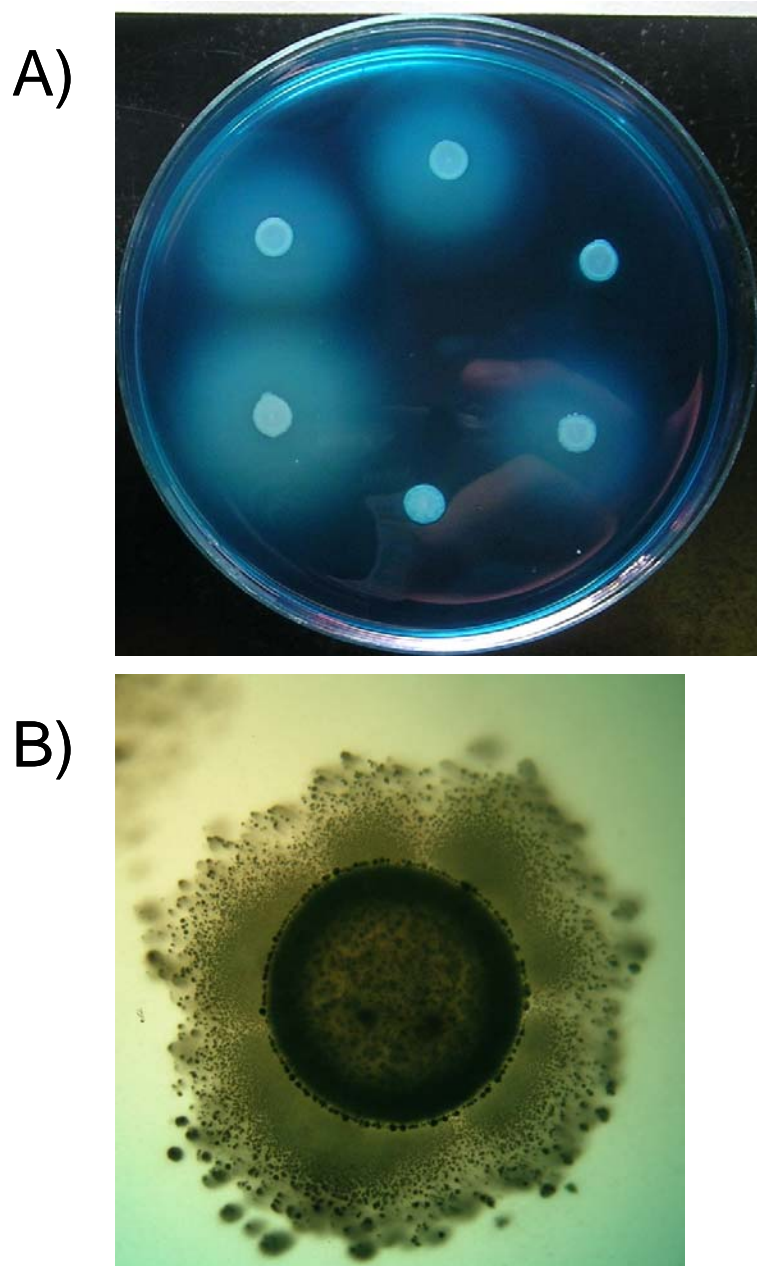


Figure 1 – Croissance sur le milieu sélectif MRSV. A) Apparence typique des salmonelles.  
B) Apparence grumeleuse d'une croissance non salmonelles (agrandie).

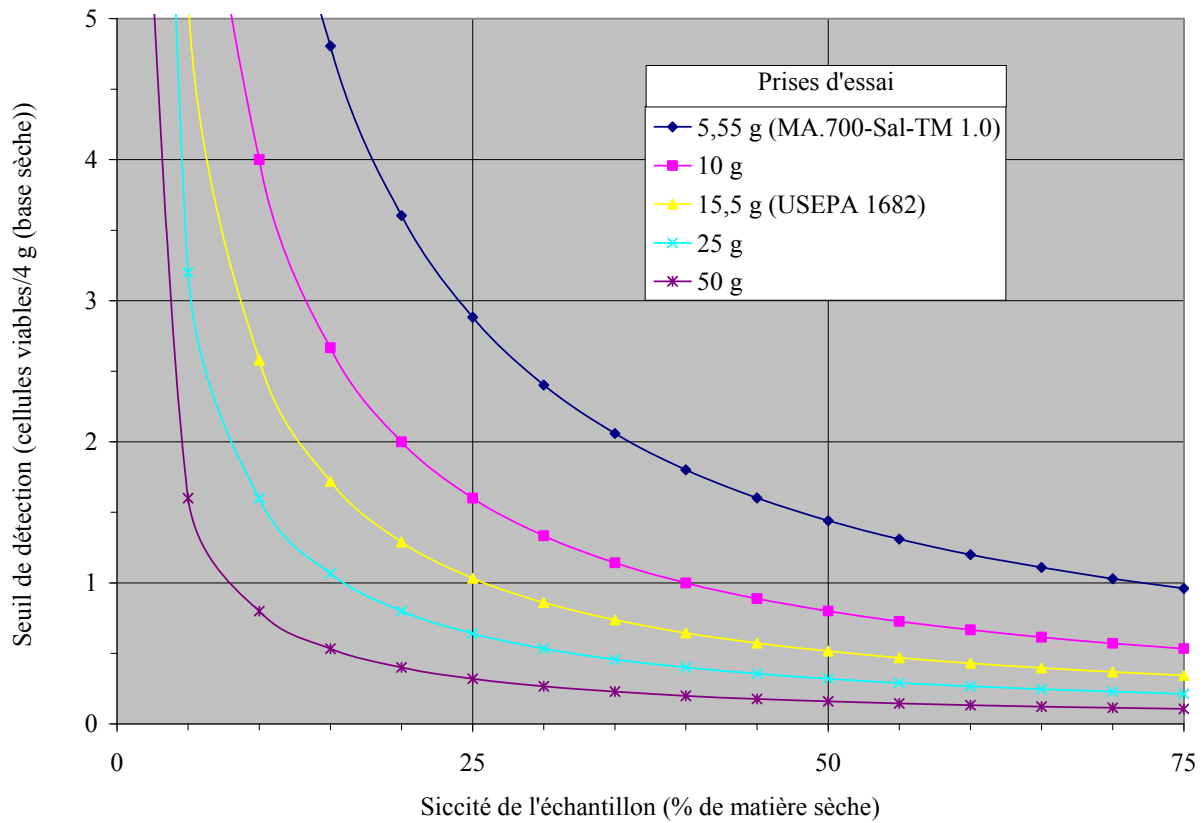


Figure 2 – Variation du seuil de détection analytique de la présente méthode en fonction de la siccité de l'échantillon pour cinq prises d'essai.

Les courbes ont été calculées avec l'équation 1 en assumant qu'une seule cellule viable de salmonelles pouvait donner un résultat positif en fonction de la masse de l'échantillon.



### Échantillon

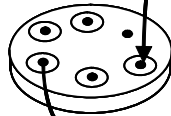
#### **Préparation et enrichissement**

x g d'échantillon dans y ml de TSB  
Homogénéisation 1 min.  
Incubation 36 °C, 24 h



#### **Sélection**

Transfert de 6 gouttes de 30 µl sur MRSV  
Incubation 42 °C, 16-48 h

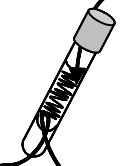


#### **Isolement**

Transfert sur XLT4  
Incubation 36 °C, 24 h

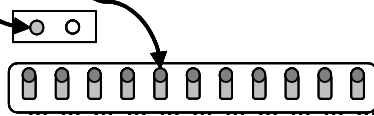


Transfert sur BHI  
Incubation 36 °C, 18-24 h



#### **Confirmation**

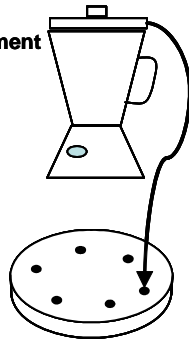
Test de l'oxydase  
Identification biochimique (24 h)



### Blanc de méthode

#### **Préparation et enrichissement**

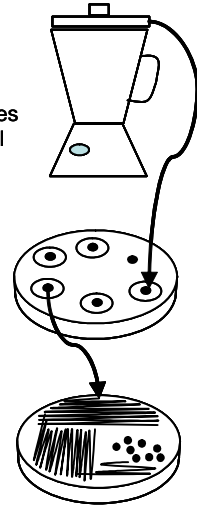
y ml TSB  
Homogénéisation 1 min.  
Incubation 36 °C, 24 h



### Contrôle de matrice

#### **Préparation et enrichissement**

20-100 UFC de salmonelles  
x g d'échantillon dans y ml de TSB  
Homogénéisation 1 min.  
Incubation 36 °C, 24 h



### Témoin positif

#### **Préparation et enrichissement**

20-100 UFC de salmonelles  
y ml TSB  
Homogénéisation 1 min.  
Incubation 36 °C, 24 h

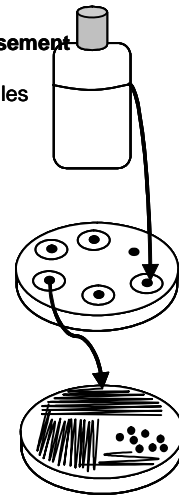


Figure 3 – Étapes de l'analyse des échantillons solides.