

# Méthode d'analyse

MA. 700 – Sal-PA 1.0  
2026-01-16 (révision 7)

Recherche des salmonelles : méthode  
présence/absence

---

### **Coordination et rédaction**

Cette publication a été réalisée par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) du ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP). Elle a été produite par la Direction des communications du MELCCFP.

### **Renseignements**

Téléphone : 418 521-3830

1 800 561-1616 (sans frais)

Formulaire : [www.environnement.gouv.qc.ca/formulaires/renseignements.asp](http://www.environnement.gouv.qc.ca/formulaires/renseignements.asp)

Internet : [www.environnement.gouv.qc.ca](http://www.environnement.gouv.qc.ca)

Dépôt légal – 2026

Bibliothèque et Archives nationales du Québec

ISBN 978-2-555-02993-4 (PDF)

Tous droits réservés pour tous les pays.

© Gouvernement du Québec – 2026

---

## Table des matières

Table des matières	iii
Avant-propos	iv
1. Domaine d'application	1
2. Principe et théorie	1
2.1 Préparation des échantillons et enrichissement non sélectif	1
2.2 Sélection sur milieu MSRV	1
2.3 Isolement sur milieu sélectif XLT4 ou XLD	2
2.4 Confirmation	2
2.5 Seuil de détection de la méthode	2
3. Interférence	3
4. Conservation	3
5. Matériel et appareillage	4
6. Réactifs et milieux de culture	4
7. Protocole d'analyse	9
7.1 Préparation des échantillons et des contrôles	10
7.2 Analyse des échantillons (toutes matrices confondues)	13
7.3 Confirmation	14
8. Calcul et expression des résultats	15
8.1 Échantillons solides	15
8.2 Échantillons liquides	15
9. Critères d'acceptabilité	15
10. Bibliographie	16
Annexe 1 : Exemple de migration sur milieu MSRV	18
Annexe 2 : Variation du seuil de détection selon la siccité de l'échantillon	19
Annexe 3 : Schéma de l'analyse	20
Annexe 4 : Analyse d'échantillons liquides peu chargés (à titre indicatif)	21

## Avant-propos

La présente méthode a été intégralement refondue. Pour en faciliter la consultation, seules les modifications majeures sont identifiées en rouge.

# 1. Domaine d'application

Cette méthode sert à rechercher les salmonelles par la méthode présence/absence. Elle s'applique aux matières résiduelles fertilisantes (MRF), aux biosolides, aux boues, aux composts, aux fumiers et à l'eau. Elle permet également de détecter des salmonelles dans les biosolides municipaux alcalins, les boues liquides alcalines d'abattoirs, les résidus de coquilles d'œuf et les résidus de désencrage chaulant après une procédure particulière de neutralisation du pH.

Toutes les matrices envisageables pour les MRF n'ont pas nécessairement été validées. Cependant, le contrôle de matrice obligatoire permet de vérifier si la méthode est appropriée pour ladite matrice.

La méthode peut servir à l'application du Code de gestion des matières résiduelles fertilisantes, et à l'application des normes suivantes : Amendements organiques – composts : CAN/BNQ 0413-200; Amendements organiques – biosolides municipaux alcalins ou séchés : CAN/BNQ 0413-400; et Amendements calciques ou magnésiens provenant de procédés industriels : BNQ 0419-090.

Cette méthode a été élaborée et validée au CEAEQ. Elle a été conçue en collaboration avec les responsables du Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes. À la validation originale, 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 coll., 2007). Lors de cet essai, des prises d'essai de 10 g d'échantillon avaient été enrichies dans 500 ml de bouillon TSB.

De plus, 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).

Les milieux de culture employés pour l'enrichissement et la sélection sont les mêmes que ceux préconisés par la méthode U.S. EPA 1682 : *Salmonella* in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium (U.S. EPA 2006).

## 2. Principe et théorie

### 2.1 Préparation des échantillons et enrichissement non sélectif

Les échantillons solides sont pesés de manière aseptique puis homogénéisés dans un bouillon non sélectif trypticase soja (TSB) à l'aide d'un mélangeur. Les échantillons liquides très chargés sont directement homogénéisés dans un bouillon TSB.

Pour les deux types de matrices, l'enrichissement bactérien dans le milieu TSB se fait à  $36,0 \pm 1,5$  °C pendant  $24 \pm 2$  heures.

### 2.2 Sélection sur milieu MSRV

Six gouttes du milieu d'enrichissement non sélectif sont déposées sur la gélose semi-solide MSRV (milieu modifié semi-solide de Rappaport-Vassiliadis). Chaque goutte doit pénétrer dans la gélose sans être étalée. Cette gélose est incubée à  $42,0 \pm 0,5$  °C pendant 16 à 48 heures 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 la figure 1 à l'annexe 1). Au terme de l'incubation, la croissance à l'extrémité du halo ne contient généralement que des salmonelles (Zimbro et coll., 2009).

Le milieu MSRV contient les éléments sélectifs suivants : chlorure de magnésium, novobiocine et vert de malachite. Le chlorure de magnésium augmente la pression osmotique et la novobiocine et le vert de

malachite inhibent la croissance des microorganismes qui ne sont pas des salmonelles. De plus, le pH acide et la température élevée d'incubation sont des éléments sélectifs de la méthode (Zimbardo et coll. 2009).

### 2.3 Isolement sur milieu sélectif XLT4 ou XLD

À la suite de la sélection sur le milieu MSRV, les salmonelles sont mises en évidence sur un milieu XLT4 (xylose lysine Tergitol 4™) ou sur un milieu XLD (xylose lysine désoxycholate).

Pour ce faire, un peu de croissance est prélevée à l'extrémité du halo dans la gélose MSRV et étalée par épuisement sur le milieu gélosé choisi : XLT4 ou XLD. Le milieu ainsiensemencé est ensuite incubé à 36,0 ± 1,5 °C pendant 24 ± 2 heures. Selon le milieu choisi, les colonies présumées du genre *Salmonella* seront : les colonies noires ou rouges à centre noir sur la gélose XLT4 ou les colonies roses translucides à rouges avec centre noir sur la gélose XLD. Dans les deux cas, le sulfure d'hydrogène formé par ces bactéries réagit avec les ions ferriques contenus dans ces milieux pour former un précipité noir.

Les deux milieux, XLD et XLT4, sont des milieux sélectifs et différentiels. Dans le milieu XLD, la sélection est assurée par le désoxycholate de sodium qui inhibe les bactéries à Gram positif, tandis que le Tergitol 4™ présent dans le milieu XLT4 inhibe la croissance des bactéries qui ne sont pas des salmonelles (Zimbardo et coll., 2009).

Dans les deux cas, la différenciation des salmonelles est basée sur la fermentation du xylose, du lactose et du saccharose 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 d'ions ferriques contenus dans les milieux. Le thiosulfate de sodium sert de source de soufre inorganique. Le chlorure de sodium maintient la pression osmotique du milieu. Enfin, le rouge de phénol agit comme indicateur de pH permettant de mettre en évidence les réactions de fermentation et de décarboxylation.

### 2.4 Confirmation

Les colonies présumées de salmonelles sur le milieu XLT4 ou XLD sont vérifiées à l'aide d'un système biochimique d'identification.

### 2.5 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 en respectant le seuil de détection inférieur à 3 salmonelles/4 g (base sèche).

La figure 2 (annexe 2) 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 :

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

g b.s. : grammes (base sèche);

g b.h. : grammes (base humide).

### 3. 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.

Le milieu sélectif MSRV est prévu pour la détection des salmonelles mobiles et est inapproprié pour la détection des salmonelles immobiles comme *Salmonella*<sup>1</sup> *Gallinarum* et *Salmonella* *Pullorum* (Evangelopoulou et coll., 2024; Santé Canada, 2016).

La mobilité des salmonelles dans le milieu gélosé MSRV 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.

Certaines salmonelles ne produisent pas de H<sub>2</sub>S et ne forment pas de précipité noir sur les milieux XLD ou XLT4. Ces salmonelles sont généralement roses à rouges sans centre noir. Sur ces milieux, les salmonelles qui fermentent le lactose peuvent former des colonies jaunes avec ou sans centre noir (ThermoFisher, 2022). En l'absence de colonies typiques, les colonies jaune rosé sans centre noir obtenues sur un milieu XLD ou XLT4 doivent être confirmées.

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.

Le milieu MSRV n'est pas adéquat pour l'isolement de *Salmonella* *Typhi* et *Salmonella* *Paratyphi* (Dusch et Altwegg, 1995).

### 4. Conservation

Le délai maximal admissible pour l'analyse est de 48 heures après le prélèvement et l'échantillon doit avoir été préservé au frais, sans être congelé (environnement à une température d'environ 4 °C), à l'aide de blocs réfrigérants. Les blocs réfrigérants ne devraient pas être en contact direct avec l'échantillon.

Pour les échantillons solides prélevés conformément au Code de gestion des matières résiduelles fertilisantes (MELCCFP), les instructions du document Protocole d'échantillonnage de matières résiduelles fertilisantes et dispositions particulières liées à l'accréditation (DR-12-MRF-02, CEAEQ) doivent avoir été suivies.

Les autres échantillons solides peuvent être prélevés dans un sac en suivant les instructions ci-dessus, dans un sac Whirl-Pak® 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.

---

<sup>1</sup>*Salmonella* *Gallinarum*, *Salmonella* *Pullorum*, *Salmonella* *Typhi* et *Salmonella* *Paratyphi* sont des sérotypes de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*.

Les échantillons liquides sont prélevés avec toutes les conditions d'asepsie nécessaires dans des contenants stériles et non toxiques pour les bactéries, de verre ou de plastique à large ouverture, en laissant un espace d'air suffisant pour permettre une agitation adéquate, par exemple en laissant au moins 2,5 cm entre la surface du liquide et le bas du bouchon. La capacité des contenants dépend des matrices à analyser. Pour des échantillons d'eaux usées (par exemple), des contenants de 250 ml sont à prévoir et des volumes minimaux de 100 ml sont requis pour permettre l'analyse de l'échantillon et le contrôle de matrice.

De plus, les contenants utilisés pour le prélèvement des échantillons 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 d'au moins 100 mg/l dans l'échantillon. Une telle concentration est suffisante pour neutraliser jusqu'à environ 15 mg/l de chlore résiduel (APHA, AWWA et WEF, 2023). Le thiosulfate de sodium agit comme agent neutralisant du chlore résiduel qui pourrait être présent dans l'eau.

À leur réception au laboratoire, les échantillons qui ne sont pas analysés dans les 4 heures qui suivent leur arrivée doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de leur analyse.

Les échantillons reçus congelés, dans des contenants non conformes ou après un délai inacceptable (> 48 heures après le prélèvement) ne doivent pas être analysés.

## 5. Matériel et appareillage

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant et une procédure de lavage adéquate est de rigueur.

Liste 1 : Matériel et appareillage

1. Plateau et spatule stériles
2. Mélangeur et récipient stériles appropriés
3. Incubateur dont la température est ajustée à  $36,0 \pm 1,5$  °C
4. Incubateur dont la température est ajustée à  $42,0 \pm 0,5$  °C

## 6. Réactifs et milieux de culture

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité ACS, à moins d'indication contraire. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement. Les réactifs équivalents d'un autre fabricant peuvent également être utilisés.

L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture et des réactifs est de l'eau distillée, déminéralisée ou ultrapure.

À moins d'indication contraire, les solutions sont conservées à température ambiante.

Liste 2 : Réactifs et milieux de culture

1. Acide chlorhydrique, HCl (n° CAS 7647-01-0)  
Solution commerciale 1 N  
  
Solution commerciale entre 10 N et 12 N



2. Solution d'hydroxyde de sodium (n° CAS 1310-73-2) 1 N

Solution commerciale 1 N.

Ou

Préparer la solution de la façon suivante : ajouter 100 ml d'une solution commerciale de NaOH 10 N dans environ 700 ml d'eau et combler jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau.

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

4. Bandelette pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase (ex. : Remel®, Pathotec®)

Conserver à environ 4 °C dans le contenant d'origine ou dans un contenant foncé ou opaque.

5. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhydre dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N et combler jusqu'à 1 000 ml avec de l'eau. **Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes ou par filtration (membrane de 0,2 µm).**

Cette solution se conserve **trois mois** à environ 4 °C.

6. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate par litre d'eau. **Le pH final doit être de  $7,2 \pm 0,5$  à 25 °C. Répartir dans des bouteilles de polypropylène ou des flacons laveurs et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.**

L'eau tamponnée de rinçage se conserve **trois mois** à environ 4 °C.

7. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate par litre d'eau. **Le pH final doit être de  $7,2 \pm 0,5$  à 25 °C. Répartir dans des bouteilles de 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de  $90 \pm 2$  ml après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes.**

**Des tubes de 9 ml d'eau de dilution peuvent aussi être utilisés. Répartir de façon stérile de l'eau tamponnée stérile dans des tubes préalablement autoclavés de 18 mm x 125 mm avec bouchon. Le volume final doit être de  $9,0 \pm 0,2$  ml.**

L'eau tamponnée de dilution se conserve **trois mois** à environ 4 °C.

8. Bouillon trypticase soja (TSB)

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 30,0 g/l et sa formulation, telle que présentée par le fabricant BD Difco™, est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau :

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

Dans un erlenmeyer de volume approprié, 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 ou de NaOH 1 N. Répartir dans des contenants appropriés. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

Ce milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de six semaines.

9. Gélose infusion cœur-cervele (BHI agar)

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 52,0 g/l et sa formulation, telle que présentée par le fabricant BD BBL™, est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau :

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

**Note : La gélose nutritive ou la gélose trypticase de soja peut aussi être utilisée comme milieux non sélectifs de propagation.**

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 52,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Sur une plaque chauffante et avec un agitateur magnétique, porter le milieu à ébullition sous agitation constante, pour en permettre la dissolution complète. 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 ou de NaOH 1 N. Répartir en volumes d'environ 8 ml dans des tubes de 16 mm x 125 mm. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes et laisser solidifier en position oblique pour former des géloses inclinées.

Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de quatre semaines.

10. Gélose modifiée semi-solide de Rappaport Vassiliadis (MSRV)

Le milieu de base MSRV (ex. : Oxoid™ CM0910) est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. La gélose MSRV est composée du milieu de base additionné d'un supplément. Le milieu de base MSRV est utilisé à raison de 31,6 g/l et sa formulation comme présentée par le fabricant Thermo Scientific™ est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau :

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

**Note : Le milieu de base MSRV est très hygroscopique.**

Le supplément sélectif MSRV (ex. : Oxoid™ SR0161E) est utilisé à raison de 1 flacon pour 500 ml de milieu, pour une concentration finale de 20 mg/l en novobiocine, et sa composition par flacon est la suivante :

Novobiocine ..... 10 mg

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 15,8 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 500 ml d'eau. Porter à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Ce milieu ne doit pas être autoclavé. Refroidir à 50 °C dans un bain-marie et ajouter stérilement le contenu d'un flacon de supplément sélectif MSRV (novobiocine) reconstitué avec 2 ml d'eau stérile. Bien mélanger et répartir en volumes d'environ 25 ml dans des boîtes de Petri de 100 mm x 15 mm. 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 ou de NaOH 1 N. Ne pas inverser les boîtes de Petri lors de l'entreposage. Le fabricant recommande de laisser sécher à l'air les géloses pendant une heure avant utilisation.

Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de deux semaines dans un contenant étanche. Il peut également être conservé à la température ambiante pendant un maximum de 48 heures (U.S. EPA, 2006).

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

#### 11. Gélose XLT4

Le milieu de base XLT4 (ex. : Biokar™ BK156HA) est disponible dans le commerce sous forme déshydratée.

La gélose XLT4 est composée du milieu de base additionné du supplément sélectif XLT4 (ex. : Biokar™ BS03908) dont la composition est la suivante :

Solution de 26 à 28 % de Tergitol 4™ (7-éthyl 2-méthyl 4-undécyl sulfate, sous forme de sel de sodium).

Le milieu de base XLT4 est utilisé à raison de 59,0 g/l et sa formulation, telle que présentée par le fabricant BD Difco™, est la suivante :

Peptone .....	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
Rouge de phénol.....	0,08 g

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 59,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Ajouter 4,6 ml de supplément pour agar XLT4 et porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Éviter de surchauffer. Ce milieu ne doit pas être autoclavé. 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 ou de NaOH 1 N. Répartir en volumes d'environ 20 ml dans des boîtes de Petri de 100 mm x 15 mm et laisser solidifier.

Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de deux semaines.

## 12. Gélose XLD (Xylose-Lysine-Désoxycholate)

Le milieu de base XLD (ex. : Thermo Scientific™ CM0469) est disponible dans le commerce sous forme déshydratée.

Le milieu est utilisé à raison de 53,0 g/l et sa formulation, telle que présentée par le fabricant Thermo Scientific™, est la suivante :

Extrait de levure .....	3 g
L-Lysine HCl.....	5 g
Xylose.....	3,75 g
Lactose.....	7,5 g
Sucrose .....	7,5 g
Désoxycholate de sodium .....	1 g
Citrate d'ammonium ferrique.....	0,8 g
Thiosulfate de sodium .....	6,8 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Agar.....	12,5 g
Rouge de phénol.....	0,08 g

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 53,0 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. Éviter de surchauffer. Ce milieu ne doit pas être autoclavé. 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 ou de NaOH 1 N. Refroidir le milieu entre 45 et 50 °C dans un bain-marie. Répartir en volumes d'environ 20 ml dans des boîtes de Petri de 100 mm x 15 mm et laisser solidifier.

Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de deux semaines.

## 13. Gélose de soja Trypticase (TSA)

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 40,0 g/l et sa formulation, telle que présentée par le fabricant BD BBL™, est la suivante :

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

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 40,0 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 ou de NaOH 1 N. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Répartir en volumes appropriés dans les boîtes de Petri de taille appropriée et laisser solidifier.

Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de quatre semaines.

## 14. Bouillon infusion cœur-cerveille (BHI)

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 37,0 g/l et sa formulation, telle que présentée par le fabricant BD BBL™, est la suivante :

Infusion cœur-cerveau (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

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 37,0 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  $7,4 \pm 0,2$  à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N ou de NaOH 1 N. Répartir en volumes de 30 ml dans des bouteilles de verre de volume approprié. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de six semaines.

15. Souche de *Salmonella* sp. mobile, autre que *Salmonella* séro groupe Typhi ou Paratyphi A

16. Suspension de salmonelles

Inoculer un volume de 30 ml de bouillon infusion cœur-cerveau avec une souche de salmonelle et incubé à  $36,0 \pm 1,5$  °C pendant 18 à 24 heures. Diluer la culture obtenue dans de l'eau tamponnée stérile. Inoculer ensuite 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.

Pour s'assurer d'inoculer les contrôles positifs et les contrôles de matrice avec 20 à 100 UFC de la souche de *Salmonella* sp., procéder à un dénombrement au préalable. **Pour ce faire, dénombrer la culture en triplicata d'une façon appropriée. Par exemple, par la technique de la membrane filtrante sur des géloses TSA, dénombrer en filtrant un volume approprié les dilutions  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$  ou toute autre dilution requise selon l'historique du laboratoire. Incuber les géloses à  $36,0 \pm 1,5$  °C pendant 24 heures et procéder au dénombrement.**

**Si des bactéries congelées sont utilisées, le lot de bactéries congelées doit avoir été dénombré au préalable pour déterminer la bonne quantité à utiliser.**

17. Système biochimique d'identification

Exemples : MicroScan® Panel, Neg ID, 2D, référence : B1017-27; API® 20 E, référence 20160.

18. Bandelettes de papier pH avec gamme d'intervalles étroits (gamme à 0,5 d'unités de pH).

Exemple : Fisherbrand™ pH Test Strips, référence : 84510FISHER.

## 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 toutes les étapes de contrôle et d'assurance de la qualité nécessaires sont réalisées conformément à ces lignes directrices.

La stérilisation aux rayons ultraviolets des entonnoirs et supports de filtre est obligatoire avant l'analyse de chaque échantillon d'eau. De plus, il est recommandé que ces équipements soient lavés et stérilisés aux rayons ultraviolets après toute série d'analyses ou interruption de travail d'une durée supérieure à 15 minutes.

**Pour chaque série d'analyses, l'analyse d'un contrôle négatif est obligatoire et l'analyse d'un contrôle positif est recommandée (non obligatoire). Pour chacun des échantillons à analyser, un contrôle de matrice (ou échantillon fortifié) doit être réalisé.**

Enfin, pour éviter tout risque de contamination des échantillons, il est recommandé de préparer les contrôles positifs et les contrôles de matrice après l'analyse des contrôles négatifs de méthode et des échantillons.

Les étapes sont schématisées à la figure 3 (voir l'annexe 3).

## 7.1 Préparation des échantillons et des contrôles

### 7.1.1 Préparation d'échantillons solides et des contrôles associés

Les échantillons solides peuvent être des biosolides, des matières résiduelles diverses, du fumier, du sol, des boues chaulées, des boues alcalines d'abattoirs, etc.

- Étaler la totalité de l'échantillon dans un plateau en acier inoxydable stérile ou un autre contenant approprié stérile. L'usage d'une hotte est recommandé pour les matières fortement odorantes.
- À l'aide de spatules stériles 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 de petites quantités de l'échantillon en divers endroits 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 les plus gros morceaux tels que des branches de bois ou des roches peuvent être écartés.
- Prévoir les prises d'essai suivantes selon le type d'échantillon à analyser :
  - Au moins 25 g d'échantillon humide pour l'application du Code de gestion des matières résiduelles fertilisantes et des normes (par exemple, CAN/BNQ 0413-200 ou CAN/BNQ 0419-90);
  - 50 g d'échantillon humide recommandés pour les autres types d'échantillons solides ou semi-solides.

**Note :** Pour les boues chaulées (boues conditionnées à la chaux) et les boues alcalines d'abattoirs, se référer au point 7.1.1.2 avant de transférer l'échantillon dans le récipient d'un mélangeur.

#### 7.1.1.1. Préparation de l'enrichissement de biosolides autres que les boues chaulées et les boues alcalines d'abattoirs

- De manière aseptique, peser la quantité requise d'échantillon et l'incorporer dans le récipient stérile d'un mélangeur.
- Additionner d'abord la moitié du volume de bouillon TSB requis pour l'enrichissement (tableau 1).

**Tableau 1 : Volume final de bouillon TSB requis pour l'enrichissement en fonction de la prise d'essai de l'échantillon**

Prise d'essai de l'échantillon (g)	Volume de TSB requis pour l'enrichissement (ml)
25	225
50	450

- Agiter le mélange pendant 1 minute à la plus basse 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 au mélange ou employer le reste du bouillon TSB pour rincer le contenant du mélangeur lorsque le mélange est transféré dans un autre contenant pour la période d'incubation. Agiter la suspension manuellement avant l'incubation.

### 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. Pour ce faire, il est possible de déposer quelques gouttes de l'échantillon prélevées stérilement sur une bandelette de pH avec une graduation appropriée.

- Cet ajustement peut être réalisé directement dans le mélangeur.
- Si nécessaire, ajuster le pH de l'homogénat avec une solution de HCl 1 N ou de NaOH 1 N de manière aseptique et homogénéiser de nouveau l'échantillon dilué.
- Revérifier le pH.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

#### 7.1.1.2. Préparation de l'enrichissement d'échantillons de boues conditionnées à la chaux et des boues alcalines d'abattoirs

Certains échantillons de boues chaulées et de boues alcalines d'abattoirs peuvent avoir un pH d'approximativement 12. Avant l'analyse, ces échantillons doivent être neutralisés, de manière à obtenir un pH final entre 6,0 et 7,5.

L'ajustement du pH doit être fait dans une hotte chimique ou une enceinte de biosécurité de classe II-B qui rejette l'air filtré à l'extérieur du laboratoire. La mesure du pH pendant l'ajustement doit se faire de manière à minimiser les risques de contamination.

- Peser la quantité requise d'échantillon (tableau 1) dans un bécher stérile.
- Ajouter environ 50 % de la quantité requise de bouillon TSB (tableau 1) et une barre d'agitation magnétique stérile.
- Placer le bécher sur une plaque agitatrice, commencer l'agitation et effectuer une mesure initiale du pH. Pour minimiser le volume d'acide ajouté à chaque échantillon, le pH doit être ajusté en utilisant du HCl concentré (entre 10 N et 12 N).

**Note :** L'ajout de HCl de normalité élevée peut produire des vapeurs.

**Note :** Il est important de ne pas employer le mélangeur pour agiter la suspension de boues dans le bouillon TSB pendant l'ajustement initial du pH. Il est nécessaire d'employer un agitateur magnétique. Une agitation trop intense avec un mélangeur au début de l'ajustement du pH risquerait de mettre les salmonelles protégées dans des agglomérats de boue en contact avec l'alcalinité de la suspension dans la phase initiale, ce qui pourrait inactiver les salmonelles et entraîner de faux résultats négatifs.

L'addition de l'acide doit être effectuée de façon graduelle pour s'assurer que le pH de la suspension ne baisse pas en dessous de 5,0, même pour une courte période.

- Laisser la solution se stabiliser entre les ajouts avant de prendre une mesure du pH. **Il est également recommandé que l'ajustement du pH soit achevé en 10-15 minutes** et surveillé pendant 15 minutes supplémentaires pour s'assurer que l'échantillon se maintient à un pH constant, entre 6,0 et 7,5.
- Verser l'échantillon à pH ajusté dans le contenant du mélangeur.
- Utiliser une portion du bouillon TSB restant pour rincer le bécher deux fois et verser le bouillon ayant servi au rinçage dans le mélangeur.

**Note :** L'atteinte et le maintien du pH visé sont importants pour le bon fonctionnement de la méthode.

**Note :** Pour le contrôle de matrice (point 7.1.1.5), les bactéries doivent être additionnées à l'échantillon dans le mélangeur après l'ajustement du pH.

- Agiter le mélange pendant 1 minute à la plus basse vitesse du mélangeur. L'agitation peut produire beaucoup de mousse dans le contenant du mélangeur.
- Vérifier de nouveau le pH de manière aseptique. Si nécessaire, ajuster de nouveau le pH dans le contenant du mélangeur pour maintenir un pH entre 6,0 et 7,5. Pour ce faire, ajouter de très petites quantités de HCl 10 N sous agitation à basse vitesse du mélangeur. Agiter pendant 1 à 2 minutes et prendre le pH entre chaque ajout.
- Ajouter ensuite le reste du volume requis de bouillon TSB au mélange ou employer le reste du bouillon TSB pour rincer le contenant du mélangeur lorsque le mélange est transféré dans un autre contenant pour la période d'incubation. Agiter la suspension manuellement avant l'incubation.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

#### **7.1.1.3. Contrôle négatif pour les échantillons solides**

- Additionner 225 ou 450 ml de bouillon d'enrichissement TSB (selon le volume requis indiqué au tableau 1) dans le récipient stérile d'un mélangeur. Ne rien ajouter de plus.
- Agiter pendant 1 minute à la plus basse vitesse du mélangeur.
- Effectuer les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

#### **7.1.1.4. Contrôle positif (facultatif) pour les échantillons solides**

- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles à 225 ou 450 ml de bouillon d'enrichissement TSB selon le volume requis (tableau 1).
- Agiter pendant 1 minute à la plus basse vitesse du mélangeur.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

#### **7.1.1.5. Contrôle de matrice (ou échantillon fortifié) pour les échantillons solides**

- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles à un double d'échantillon en suspension dans le bouillon d'enrichissement TSB, **après ajustement du pH au besoin.**
- **Dans le cas des boues chaulées et des boues alcalines d'abattoirs (ou autres échantillons alcalins), ajuster le pH de l'échantillon dans le bouillon TSB en suivant les instructions du point 7.1.1.2 avant d'ajouter la suspension bactérienne.**
- Agiter pendant 1 minute à la plus basse vitesse du mélangeur.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

### **7.1.2 Préparation d'échantillons liquides très chargés (lisier, eaux usées, etc.)<sup>2</sup>**

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 et l'incorporer dans 450 ml de bouillon d'enrichissement TSB. Homogénéiser en agitant le contenant manuellement.

---

<sup>2</sup> La méthode de préparation de liquides peu chargés (eau de rivière, eau potable, etc.) est décrite à titre indicatif à l'annexe 4.



## 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 (voir au point 7.1.1.1).
- Si nécessaire, ajuster le pH de l'homogénat avec une solution de HCl 1 N ou de NaOH 1 N de manière aseptique.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

### 7.1.2.1. Contrôle négatif pour les échantillons liquides très chargés

- Mesurer 50,0 ml d'eau stérile à l'aide d'un cylindre gradué et l'incorporer à 450 ml de bouillon d'enrichissement TSB. Ne rien ajouter de plus.
- Effectuer les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

### 7.1.2.2. Contrôle positif (facultatif) pour les échantillons liquides très chargés

- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles à 450 ml de bouillon d'enrichissement TSB. Homogénéiser en agitant le contenant manuellement.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

### 7.1.2.3. Contrôle de matrice des échantillons liquides très chargés

- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles à un double d'échantillon en suspension dans le bouillon d'enrichissement TSB, **après ajustement du pH au besoin.**
- Homogénéiser en agitant le contenant manuellement.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

## 7.2 Analyse des échantillons (toutes matrices confondues)

### 7.2.1 Enrichissement non sélectif

- Incuber les bouillons d'enrichissement (TSB) préparés à la section 7.1 à  $36,0 \pm 1,5$  °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.

### 7.2.2 Sélection

- Sans les étaler, déposer six gouttes d'environ 30 µl séparées sur une gélose MSRV pour chaque bouillon d'enrichissement.
- Répartir les gouttes sur la surface de la gélose (voir la figure 1 à l'annexe 1). Laisser les gouttes pénétrer dans la gélose en conservant la gélose à l'endroit pendant environ une heure à la température ambiante, ou jusqu'à ce que les gouttes soient absorbées. Procéder ensuite rapidement à l'étape suivante.
- Incuber les boîtes de Petri à  $42,0 \pm 0,5$  °C pendant 16 à 48 heures dans un incubateur à air chaud en conservant un niveau d'humidité adéquat. Ne pas incuber les boîtes de Petri 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 d'une période d'incubation de 16 à 24 heures, examiner les boîtes et rechercher un halo blanchâtre de croissance qui s'éloigne d'environ 1 à 2 cm du point d'inoculation (voir l'exemple à la figure 1 en annexe). Cela indique la présence possible de salmonelles mobiles.

- Il est important de remettre à l'incubateur, jusqu'à atteindre une durée totale de 48 heures d'incubation, les boîtes de Petri ne présentant pas de halo blanchâtre autour des points d'inoculation. Il faut attendre 48 heures 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 7.2.3 pour les échantillons qui présentent un halo de croissance après 16 à 24 heures d'incubation sur la gélose MSRV sans attendre la période de 48 heures.

**Note : 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 heures avant de déclarer l'absence de salmonelles dans un échantillon.**

### 7.2.3 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 par épuisement sur le milieu XLT4 ou XLD 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 ou XLD.
- Incuber les géloses XLT4 ou XLD à  $36,0 \pm 1,5$  °C pendant  $24 \pm 2$  heures.

### 7.2.4 Observation

- Après la période d'incubation, observer et noter les résultats :
  - Sur la gélose XLT4, les colonies caractéristiques des salmonelles sont entièrement noires, roses à rouges avec centre noir, jaunes avec centre noir, ou plus rarement, roses à rouges seulement.
  - Sur la gélose XLD, les colonies caractéristiques sont noires ou roses à rouges avec centre noir, jaunes avec centre noir, ou plus rarement, roses seulement. Les colonies translucides roses à rouges sont aussi considérées comme caractéristiques des salmonelles.
  - Sur les géloses XLT4 et XLD, les autres espèces forment généralement des colonies jaunes sans centre noir. Des colonies jaune rosé sans centre noir peuvent correspondre à des salmonelles (Miller et coll., 1991, 1992; ThermoFisher, 2022). En l'absence de colonies typiques, ces colonies doivent être confirmées.
  - L'identification obtenue sur les milieux XLT4 et XLD est présomptive. L'étape de la confirmation (7.3) est nécessaire.

## 7.3 Confirmation

### 7.3.1 Propagation des souches suspectes

Repiquer au moins une colonie par morphotype caractéristique des salmonelles obtenues sur chacun des milieux XLT4 ou XLD sur autant de géloses infusion cœur-cerveau (BHI).

Incuber à  $36,0 \pm 1,5$  °C pendant 18 à 24 heures.

### 7.3.2 Épreuve de la cytochrome-oxydase

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. Se référer aux instructions du fabricant pour l'utilisation des bandelettes.

Les salmonelles sont oxydase négative.

### 7.3.3 Système biochimique d'identification

Identifier les colonies caractéristiques de salmonelles et oxydase négative à l'aide d'un système biochimique d'identification Microscan® (à partir de la croissance obtenue sur BHI). Se référer aux instructions du fabricant pour l'utilisation du système biochimique d'identification.

### 7.3.4 Interprétation

La détection d'au moins une colonie caractéristique des salmonelles sur un milieu XLT4 ou XLD, 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. Calcul et expression des résultats

### 8.1 Échantillons solides

Reporter 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/25 g (base humide) ».

### 8.2 Échantillons liquides

Reporter la présence ou l'absence de salmonelles par rapport au volume total d'échantillon analysé.

Par exemple : « PRÉSENCE/50 ml ».

## 9. Critères d'acceptabilité

Toutes les exigences précisées dans le document [DR-12-SCA-02](#), intitulé *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, doivent être respectées.

La température des incubateurs doit être maintenue à l'intérieur des critères pendant toute la durée de l'incubation.

Il n'y a pas de croissance caractéristique sur la gélose MSRV à partir du contrôle négatif effectué au moment de l'analyse.

Des colonies caractéristiques des salmonelles sont obtenues sur la gélose XLT4 ou XLD préparée à partir du contrôle de matrice (et du contrôle positif s'il est utilisé).

## 10. Bibliographie

**Note : Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, se référer à la dernière édition du document.**

BUREAU DE NORMALISATION DU QUÉBEC. Amendements organiques – Composts (CAN/BNQ 0413-200). Norme nationale du Canada, 2016, 58 p.<sup>3</sup>

BUREAU DE NORMALISATION DU QUÉBEC. Amendements de sols – Biosolides municipaux alcalins ou séchés (CAN/BNQ 0413-400). Norme nationale du Canada, 2009.<sup>4</sup>

BUREAU DE NORMALISATION DU QUÉBEC. Amendements calciques ou magnésiens provenant de procédés industriels (BNQ 0419-090). Norme nationale du Canada, 2015, 48 p.

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*, 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, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2018, 38 p.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. Protocole d'échantillonnage de matières résiduelles fertilisantes et dispositions particulières liées à l'accréditation, DR-12-MRF-02, Québec, Ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP), 2024, 24 p. [Protocole d'échantillonnage de matières résiduelles fertilisantes et dispositions particulières liées à l'accréditation (DR-12-MRF-02)]

DUSCH, H. et M. ALTWEGG. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(4), 802–804, 1995.

EVANGELOPOULOU, G., BURRIEL, A.R. et N. SOLOMAKOS. Distinctive culture expressions of *Enterobacteria* interfering with isolation of *Salmonella* spp. during the application of the recommended ISO 6579-1:2017. *Applied Sciences*, 14 (3), 953, 2024.

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. Règlement sur la qualité de l'eau potable, c. Q-2, r. 40, Éditeur officiel du Québec, Édition courante.

---

<sup>3</sup> Au moment de la publication de la méthode, l'édition 2016 de cette norme était archivée et la norme est en révision : <https://bnq.gc.ca/fr/normalisation/environnement/composts.html>. Vu en date du 2025-12-15.

<sup>4</sup> Au moment de la publication de la méthode, l'édition 2009 de cette norme était archivée. Une nouvelle édition est en cours de production sous le titre Amendements de sols – Biosolides. <https://boutique.bnq.gc.ca/fr/catalogue?numeroNorme=0413-400&type=NRM>. Vu en date du 2025-12-15.

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC, Code de gestion des matières résiduelles fertilisantes (CGMRF), Q-2, R. 9.02, Éditeur officiel du Québec, Edition courante. [\[Encadrement réglementaire des matières résiduelles fertilisantes \(MRF\)\]](#)

HÉBERT, Marc. Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes : Critères de référence et normes réglementaires – Édition 2015. Québec. ISBN- 978-2-550-72954-9, 216 p.

MILLER, R.G., TATE, C. R., MALLISON, E. T. et J.A. SCHERRER. Xylose-Lysine-Tergitol 4: An improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. Poultry Science, 70, 2429-2432, 1991.

MILLER, R.G., TATE, C. R., MALLISON, E. T. et J.A. SCHERRER, Xylose-Lysine-Tergitol 4: An improved selective agar medium for the isolation of *Salmonella*. Poultry Science, 71, 398, 1992.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT, DE LA LUTTE CONTRE LES CHANGEMENTS CLIMATIQUES, DE LA FAUNE ET DES PARCS. Code de gestion des matières résiduelles fertilisantes (CGMRF) (Q-2, R. 9.02) – Guide de référence, version 1.0, 12 septembre 2025. [\[Encadrement réglementaire des matières résiduelles fertilisantes \(MRF\)\]](#).

SANTÉ CANADA, DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS (DGPSA). MFLP-75 : Méthode d'isolement des espèces du genre *Salmonella* sur milieu semi-solide de Rappaport-Vassiliadis (MSRV) modifié. Dans Volume 3. Compendium des méthodes analytiques. 2016.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA). *Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium*, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., 2006.

THERMOFISHER. X.L.D. Medium. Référence: CM0469B/R/T/W. 2022. [\[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/Instructions/MBD\\_BT\\_IFU-0525%20CM0469R%20XLD%20MEDIUM.pdf\]](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MBD/Instructions/MBD_BT_IFU-0525%20CM0469R%20XLD%20MEDIUM.pdf)

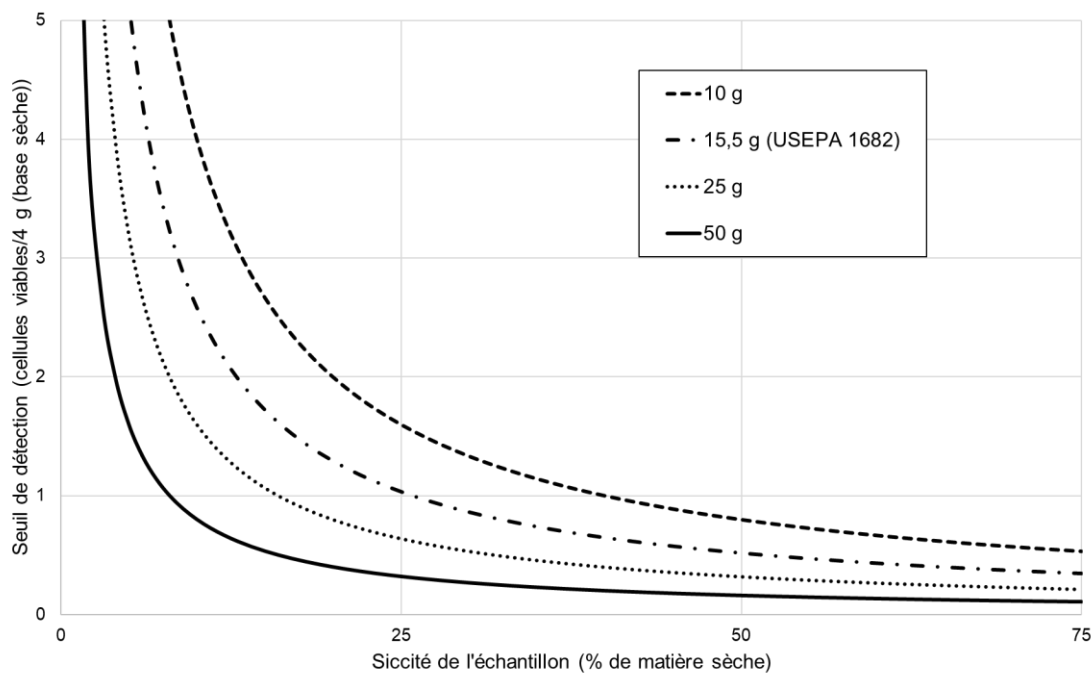
ZIMBRO, M. J., POWER, D. A., MILLER, S. M., WILSON, G. E., et J. A. JOHNSON, éditeurs. *Difco™ & BBL™ – Manual of Microbiological Culture Media*, 2<sup>nd</sup> Edition, BD Diagnostics – Diagnostic Systems, Sparks, Maryland, États-Unis, 2009, 686 p.

## Annexe 1 : Exemple de migration sur milieu MSRV



**Figure 1 : Croissance sur le milieu sélectif MSRV. Apparence typique de la migration des salmonelles (halos blancs).**

## Annexe 2 : Variation du seuil de détection selon la siccité de l'échantillon



**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 (voir la section 2.5 Seuil de détection de la méthode) en presumant qu'une seule cellule viable de salmonelle pouvait donner un résultat positif en fonction de la masse de l'échantillon.

**Figure 3 : Étapes schématisées de l'analyse des échantillons solides pour la détection de *Salmonella*.**





## Annexe 4 : Analyse d'échantillons liquides peu chargés (à titre indicatif)

La méthode décrite précédemment est prévue pour des échantillons solides ou des liquides chargés. Cependant, pour des besoins particuliers, cette méthode peut être adaptée pour l'analyse d'échantillons de liquides peu chargés comme de l'eau de rivière, de l'eau potable, etc.

Pour l'analyse de ce type de matrices, les consignes ci-après doivent être appliquées à l'étape de préparation. Les étapes d'analyse indiquées à la section 7.2 (enrichissement non sélectif, sélection) et la méthode de confirmation (section 7.3) sont les mêmes.

### Préparation d'échantillons liquides peu chargés (eau de rivière, eau potable, etc.)

- Bien homogénéiser l'échantillon en l'agitant d'un mouvement vertical vigoureux.
- Stériliser les entonnoirs et les supports à filtre dans le stérilisateur à rayons ultraviolets pendant deux 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 pince 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 un volume 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 à l'aide d'un flacon laveur.
- À l'aide d'une pince stérilisée par flambage à l'alcool, immerger la ou les membranes filtrantes dans une bouteille contenant 75 ml de bouillon d'enrichissement TSB.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

### Contrôle négatif pour les échantillons liquides peu chargés

- Avant de filtrer le premier échantillon, rincer la paroi intérieure de l'entonnoir avec 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage. Filtrer sur une membrane stérile.
- À l'aide d'une pince stérilisée par flambage à l'alcool, immerger la membrane filtrante dans 75 ml de bouillon TSB.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

**Contrôle positif (facultatif) pour les échantillons liquides peu chargés**

- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles à au moins 250 ml d'eau tamponnée stérile.
- Filtrer sur une membrane filtrante stérile, puis rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage stérile à l'aide d'un flacon laveur.
- À l'aide d'une pince stérilisée par flambage à l'alcool, immerger la membrane filtrante dans 75 ml de bouillon TSB.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.

**Contrôle de matrice des échantillons liquides peu chargés**

- Additionner entre 20 et 100 UFC de salmonelles à un double de l'échantillon.
- Filtrer sur une membrane filtrante stérile rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage stérile à l'aide d'un flacon laveur.
- À l'aide d'une pince stérilisée par flambage à l'alcool, immerger la membrane filtrante dans 75 ml de bouillon TSB.
- Immerger la membrane filtrante dans 75 ml de bouillon TSB.
- Effectuer ensuite les étapes indiquées à la section 7.2 Analyse des échantillons.



**Environnement,  
Lutte contre  
les changements  
climatiques,  
Faune et Parcs**

**Québec** 