



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES DANS LES ALIMENTS ET LES ÉCHANTILLONS
ENVIRONNEMENTAUX AU MOYEN DES PLAQUES DE DÉNOMBREMENT
DES COLIFORMES À HAUTE SENSIBILITÉ Petrifilm^{MD} 3MTM (HSCC)**

**Don Warburton
Division de l'évaluation
Bureau de dangers microbiens, Direction des aliments
Localisateur postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A 0L2**

Courriel : Don_Warburton@hc-sc.gc.ca

1. APPLICATION

Cette méthode s'applique au dénombrement des coliformes dans les aliments et les échantillons environnementaux. Les directives sur la tolérance sont spécifiques au produit analysé. Cette méthode révisée remplace la méthode MFLP-85 datée d'octobre 1996.

2. PRINCIPE

Les plaques Petrifilm sont un produit prêt à utiliser mis au point par la société 3M, St. Paul, MN 55144-1000 (États-Unis). Les pellicules sont recouvertes de milieux de culture; il n'est donc pas nécessaire de préparer les milieux et des économies en main-d'oeuvre et en temps sont ainsi réalisées. Les coliformes peuvent être dénombrés sur les plaques Petrifilm de dénombrement des coliformes à haute sensibilité (HSCC). On utilise des plaques de cultures bactériennes qui contiennent un milieu sec et un agent gélifiant hydrosoluble à froid. On ajoute des échantillons non dilués ou dilués directement sur les plaques, à raison de 5,0 ml par plaque. Une pression exercée sur le diffuseur en plastique placé sur le dessus de la pellicule étale l'échantillon sur une surface de croissance de 60 cm². Après avoir laissé l'agent gélifiant se solidifier, les plaques sont incubées et dénombrées. Pour des résultats d'une sensibilité de 1 coliforme par gramme, il faut diluer le produit à un ratio de 1:5; pour une sensibilité de 2 coliformes par gramme, le ratio de dilution doit être de 1:10.

2.1 3M Microbiology est conforme à la norme ISO (Organisation internationale de normalisation) 9001. Selon les études collaboratives et les études de validation, la méthode Petrifilm HSCC n'est pas très différente des méthodes classiques (7.1 à 7.4, 7.6 à 7.8).

2.2 Selon les données présentées au Comité des méthodes microbiologiques de Santé Canada, la méthode, qui ne s'appliquait qu'aux produits laitiers, s'applique maintenant à tous les aliments et aux échantillons environnementaux (7.3, 7.8).

3. DÉFINITION DES TERMES

- 3.1 Voir l'annexe A du volume 3.
- 3.2 Les plaques Petrifilm HSCC contiennent les nutriments du milieu à la bile et au rouge violet (VRB), un agent gélifiant hydrosoluble à froid et un indicateur au chlorure de 2,3,5-thiophényltétrazolium (TTC). L'indicateur au TTC contenu dans la plaque est un système à libération lente qui prévient la toxicité du colorant au TTC. La date de péremption et le numéro de lot sont indiqués sur chaque paquet de plaques Petrifilm. Le numéro de lot apparaît également sur chaque plaque.
- 3.3 Les coliformes fermentent le lactose contenu dans le milieu pour produire du gaz. Le gaz est emprisonné par les pellicules et forme une petite(s) bulle(s) associée(s) à une colonie rouge sur la plaque Petrifilm HSCC.
- 3.4 Le diffuseur en plastique fourni avec les plaques Petrifilm HSCC est conçu pour étaler l'échantillon ou un inoculum d'échantillon dans la zone de croissance de la plaque. La zone de croissance circulaire des plaques inoculées contient 60 carrés d'un cm tracés sur la base de la pellicule.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 3.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

- 5.1 Plaques Petrifilm HSCC 6405/6415 (3M Canada, Inc., B.P. 5757, London (Ontario) N6A 4T1)
 - 5.1.1 Plaques Petrifilm HSCC. Entreposer à une température de 8° C ou moins.
 - 5.1.2 Diffuseur en plastique, numéro de catalogue 6481.
 - 5.1.3 Feuillet d'instruction, incluant le mode d'emploi. Un « Guide d'interprétation » est disponible sur demande.
- 5.2 Diluants stériles appropriés : solution tampon au phosphate Butterfield (7.5), eau peptonée à 0,1 %, diluant salin peptoné, solution saline (0,85 à 0,90 %), eau déionisée et solutions de Ringer à 0,25 %. Si l'on indique du citrate dans la norme, remplacer par une solution tampon tempérée (40 à 45° C) au phosphate Butterfield.

Note : Ne pas utiliser de solution tampon au citrate ni de solution contenant du thiosulfate de sodium avec la méthode Petrifilm.

- 5.3 Stomacher, mélangeur ou l'équivalent.
- 5.4 Incubateur pouvant maintenir une température de 32° ou de 35° C.

Note : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains d'eau sont maintenus à la température recommandée. Lorsque la température recommandée dans le texte de la méthode est de 35° C, la température de l'incubateur peut être de 35 ± 1,0° C. De même, des températures plus basses de 30° ou de 25° C peuvent être à ± 1,0° C près. Toutefois, pour des températures plus élevées, de 43° ou de 45,5° C par exemple, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie ± 0,5° C près. Des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on tente d'isoler.

- 5.5 pH-mètre ou papier pouvant mesurer une valeur de pH entre 0,3 et 0,5 à l'intérieur d'une gamme de 6,0 à 8,0.

- 5.6 NaOH 1N, si un ajustement du pH est nécessaire.
- 5.7 Pipettes ou pipettes automatiques ayant une capacité nominale de 5,0 ml.
- 5.8 Compteur de colonies ou loupe lumineuse.

6. PROCÉDURE

Procéder de la façon suivante pour effectuer l'analyse :

6.1 Manipulation des échantillons d'aliments

6.1.1 À l'exception des aliments stables à la température de la pièce, avant l'analyse, conserver les échantillons au réfrigérateur (2 à 8 °C) ou au congélateur selon la nature du produit. Dégeler les échantillons au réfrigérateur ou en respectant les conditions de temps et de température afin d'empêcher la croissance ou la destruction des micro-organismes.

6.1.2 Procéder à l'analyse des échantillons aussitôt que possible après leur réception au laboratoire.

6.2 Préparation pour l'analyse

6.2.1 Préparer le diluant stérile. Désinfecter la surface de travail.

6.2.2 Placer la plaque Petrifilm sur une surface plane. Inscrire l'information relative à l'échantillon sur la pellicule.

6.3 Préparation de l'échantillon

6.3.1 Afin d'assurer une unité analytique vraiment représentative, mélanger les liquides jusqu'à ce que le contenu soit homogène.

6.3.1.1 Pour les échantillons de produits laitiers, appliquer 5,0 ml directement ou faire des dilutions décimales dans le diluant approprié (voir 5.2). Mélanger vigoureusement la préparation de dilution.

6.3.1.2 Un minimum de 1:5 (24,75 g / 99 ml d'eau de dilution) ou une dilution décimale dans le diluant approprié (voir 5.2) est nécessaire pour le lait au chocolat, le lait concentré, le lait évaporé, la crème épaisse ou légère, la crème glacée et les mélanges glacés. Mélanger vigoureusement la préparation de dilution.

6.3.1.3 Un minimum de 1:10 ou une dilution décimale dans le diluant approprié (voir 5.2) est nécessaire pour le beurre, le lait de beurre, le fromage, le fromage cottage, les trempettes, la crème sure, le yogourt et le yogourt glacé. Mélanger vigoureusement la préparation de dilution.

6.3.2 Si l'échantillon est un aliment solide, prendre des portions représentatives dans différentes parties de l'échantillon. Préparer une dilution d'au moins 1:10 dans un diluant approprié (voir 5.2). Mélanger vigoureusement.

6.3.3 Dans le cas des produits acides, ajuster le pH de l'échantillon dilué entre 6,5 et 7,5 avec du NaOH 1N. Mélanger vigoureusement.

6.4 Inoculation et incubation

6.4.1 Relever la pellicule du dessus et inoculer avec précaution 5,0 ml d'échantillon ou d'échantillon dilué au centre de la pellicule du dessous. Utiliser une pipette ou une pipette automatique pour l'ajout de l'échantillon.

- 6.4.2 Remettre la pellicule du dessus en place. Dérouler avec précaution la pellicule du dessus de la plaque Petrifilm HSCC vers le bas afin d'éviter d'emprisonner des bulles d'air ou de pousser l'échantillon hors de la pellicule du dessous.
- 6.4.3 Distribuer l'échantillon également en exerçant une pression vers le bas sur le centre du diffuseur en plastique. Ne pas faire glisser le diffuseur sur la pellicule. Laisser reposer la plaque de deux à cinq minutes afin que le gel puisse se solidifier.
- 6.4.4 Faire incuber les plaques à l'horizontale, le côté clair sur le dessus, en piles de 10 plaques ou moins pendant 24 ± 2 heures. Suivre les normes en vigueur relativement à la température d'incubation: par exemple, 32°C ou 35°C.
- 6.4.5 Replacer les plaques inutilisées dans le sachet métallique. Fermer le sachet hermétiquement en repliant et en collant l'extrémité ouverte. Entreposer le sachet refermé dans un endroit sec et frais. Une fois le sachet ouvert, le délai d'utilisation des plaques est de un mois. L'exposition des plaques Petrifilm à des températures dépassant 25°C ou à des conditions d'humidité relative de plus de 50 % peut réduire l'efficacité des plaques. Ne pas utiliser les plaques qui présentent une décoloration orange ou brune. La date de péremption et le numéro de lot sont inscrits sur chaque sachet de plaques Petrifilm. Le numéro de lot figure aussi sur chaque pellicule.

6.5 Lecture des résultats

- 6.5.1 Effectuer le dénombrement rapidement après la période d'incubation. Au besoin, c'est-à-dire seulement si le dénombrement ne peut pas être fait immédiatement, entreposer les plaques dans le congélateur. Il faut toutefois éviter d'en prendre l'habitude.
- 6.5.2 Utiliser un compteur de colonies standard pour le dénombrement; au besoin, une loupe lumineuse peut être utilisée pour faciliter le dénombrement.
- 6.5.3 La zone de croissance circulaire est d'environ 60 cm². Il est possible d'établir des estimations des plaques qui contiennent plus de 150 colonies en déterminant le nombre moyen de colonies de quelques carrés représentatifs et en multipliant le résultat par 60 pour obtenir le total de chaque plaque.
- 6.5.4 Calculer le nombre de colonies par ml ou par g d'échantillon à partir du nombre de colonies obtenues sur les plaques choisies à des niveaux de dilution qui donnent un résultat significatif sur le plan statistique.
- 6.5.5 Pour compter les colonies sur des plaques en double de dilutions successives, calculer le nombre moyen de colonies de chaque dilution avant de déterminer le nombre moyen de micro-organismes.
- 6.5.6 Afin d'isoler des colonies pour identification plus poussée, relever la pellicule du dessus et prélever la colonie sur le gel.

6.6 Interprétation et résultats

- 6.6.1 Les colonies de COLIFORMES sont rouges et associées de près (environ le diamètre d'une colonie) au gaz emprisonné après 24 heures. Les colonies qui ne sont pas associées au gaz (bulle située à >1 diamètre de colonie de celles-ci) sont d'autres organismes non-coliformes à gram-négatif.
- 6.6.2 Des bulles artefact peuvent être présentes.
- 6.6.3 Certains coliformes, lorsqu'ils sont présents en quantités importantes, occasionnent une formation excessive de gaz et forment de petites colonies non distinctes. Il faut alors indiquer que les colonies sont «trop nombreuses pour être dénombrées». Il arrive à l'occasion, sur des plaques surchargées, qu'il soit impossible de distinguer les colonies et le gaz. L'acide produit par les

colonies de coliformes sur une plaque surchargée fait virer au rouge foncé la couleur du milieu sur la plaque Petrifilm. On peut confirmer les résultats «trop nombreux pour être dénombrés» en procédant à une autre dilution de l'échantillon.

7. RÉFÉRENCES

- 7.1 American Public Health Association. 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination for Foods*, 4^e éd. APHA, Washington, DC. pp 76.
- 7.2 AOAC. 2000. Méthode officielle 996.02. *Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL*. 17^e éd. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD.
- 7.3 Association Française de Normalisation (AFNOR) : No de certificat : 3M 01/7-03/99. *3M Petrifilm High Sensitivity test for enumeration of coliforms*. Tour Europe, 92049 Paris La Défense Cedex.
- 7.4 Curiale, M.S., Gangar, V. D'Onorio, A., Gambrel-Lenarz, S. et McAllister, J.S. 1997. *High-Sensitivity Dry Rehydratable Film Method for Enumeration of Coliforms in Dairy Products: Collaborative Study*. Journal of AOAC INTERNATIONAL. **80**: 505-516.
- 7.5 Food and Drug Administration. 1998. *Bacteriological Analytical Manual*, 8^e éd. Rév. A. AOAC International, Gaithersburg, Md. Appendix 3.64 (R11).
- 7.6 U.S. Department of Health and Human Services. *Milk Evaluation Form. Standard Plate Count, Coliform, and Simplified Count Methods*, FORM FDA 2400a (3/01). pp 6-7.
- 7.7 U.S. Department of Health and Human Services. 1999. *Grade "A" Pasteurized Milk Ordinance: Recommendations of the Public Health Service*. Publication No. 229. Washington, DC. US Gov't Print Office. Révision de 1999.
- 7.8 Silk, T.M., Ryser, E.T. et Donnelly, C.W. 1997. *Comparison of Methods for Determining Coliform and Escherichia coli Levels in Apple Cider*. J. Food Protection. **60**:1302-1305.