



DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS

OTTAWA

**DÉNOMBREMENT DES LEVURES ET DES MOISSURES
DANS LES PRODUITS ET LES INGRÉDIENTS ALIMENTAIRES
AU MOYEN DE PLAQUES Petrifilm^{MD} 3M^{MD} POUR DÉNOMBREMENT DES LEVURES ET MOISSURES**

Don Warburton
Division de l'évaluation, Bureau de dangers microbiens
Direction des aliments, DGPS
Repère postal : 2204A1
Ottawa (Ontario) K1A OL2

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

1. APPLICATION

La présente méthode est applicable au dénombrement des levures et des moisissures dans les produits et ingrédients alimentaires. Ce produit peut aussi servir à l'échantillonnage environnemental (voir les procédures de laboratoire MFLP-41A, MFLP-41B et d'autres méthodes dans le volume 3 du Compendium). Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-32, datée d'avril 1997.

2. PRINCIPE

Les plaques Petrifilm sont un produit prêt à utiliser mis au point par la société 3M, de St. Paul, MN. Les pellicules sont recouvertes de milieux ; il n'est donc pas nécessaire de préparer des milieux et l'analyse coûte moins cher en main-d'œuvre et en temps. Il est possible de dénombrer les levures et les moisissures au moyen des plaques de dénombrement des levures et des moisissures Petrifilm. La méthode est fondée sur des plaques contenant un milieu sec et un gélifiant hydrosoluble à froid. Des échantillons de 1 ml sont ajoutés directement sur les plaques. On appuie sur la pellicule du dessus avec le diffuseur en plastique pour étaler l'échantillon sur la zone de culture de 30 cm². Après avoir laissé le gélifiant se solidifier, les plaques sont incubées et dénombrées. Cette méthode a été étudiée à fond en regard des méthodes classiques (7.1 - 7.7).

La société *3M Microbiology* est certifiée selon la norme ISO (*International Standards Organisation*) 9001.

3. DÉFINITIONS DES TERMES

3.1 Voir l'annexe A du volume 2.

3.2 Les plaques de dénombrement des levures et des moisissures Petrifilm contiennent des nutriments et des antibiotiques, un gélifiant hydrosoluble à froid et du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP), un indicateur de l'activité enzymatique de la phosphatase. Le BCIP rend la culture plus visible sur la plaque.

- 3.3 Des diffuseurs en plastique sont fournis avec les plaques Petrifilm. La face concave sert à étaler l'échantillon dans la zone de croissance.

4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'annexe B du volume 2.

5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

- 1) Plaques de dénombrement des levures et des moisissures Petrifilm 6407/6417 (3M Canada Inc., C.P. 5757, London (ON) N6A 4T1).
 - 1.1) Plaques de dénombrement des levures et des moisissures Petrifilm. Conserver à une température de 8 °C ou moins.
 - 1.2) Diffuseur en plastique
 - 1.3) Feuillet d'instruction, y compris le mode d'emploi. Le « Guide d'interprétation » est disponible sur demande.
- 2) Diluants appropriés : solution tampon au phosphate de Butterfield, eau peptonée à 0,1 % et eau distillée.

Note: Ne pas utiliser de solution tampon au citrate ou de thiosulfate de sodium avec la méthode de la plaque Petrifilm. Si l'on recommande une solution tampon au citrate, il faut la remplacer par une solution tampon au phosphate de Butterfield réchauffée (40 à 45 °C).

- 3) Appareil « stomacher », mélangeur ou l'équivalent.
- 4) Incuber sur la paille ou dans un Incubateur capable de maintenir une température de 20 à 25 °C.
- 5) Compteur de colonies et/ou loupe lumineuse.

Note : Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie sont maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 35 ± 1,0 °C. De même, des températures plus basses à 30 °C ou à 25 °C peuvent être à ± 1,0 °C près. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 °C ou 44,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie, à ± 0,5 °C près. Des températures plus élevées peuvent être létales pour le micro-organisme qu'on cherche à isoler.

6. MARCHE À SUIVRE

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. Faire dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou pendant une période et une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.
- 6.1.2 Analyser les échantillons le plus rapidement possible après leur réception au laboratoire.

6.2 Préparation pour l'analyse

- 6.2.1 Avoir du diluant stérile à portée de la main. Désinfecter la surface de travail.
- 6.2.2 Déposer la plaque Petrifilm sur une surface plate. Identifier l'échantillon sur la pellicule.

6.3 Préparation de l'échantillon

Afin d'assurer une unité analytique vraiment représentative, agiter les liquides jusqu'à ce que le contenu soit homogène. Dans le cas des solides, prélever des portions représentatives à différents endroits de l'échantillon. Préparer une dilution 1:10 dans un diluant approprié (voir 5.2). Mélanger soigneusement.

6.4 Inoculation et incubation

- 6.4.1 Relever la pellicule du dessus et inoculer avec précaution 1 ml d'échantillon ou d'échantillon dilué au centre de la pellicule du dessous. Utiliser une pipette ou une seringue à pipetage continu.
- 6.4.2 Rabattre la pellicule du dessus sur l'échantillon.
- 6.4.3 Distribuer l'échantillon également en appuyant sur le centre du diffuseur en plastique, la face concave en dessous. Ne pas faire glisser le diffuseur sur la pellicule. Laisser reposer la plaque pendant au moins 1 minute afin de laisser solidifier le gel.
- 6.4.4 Remettre les plaques inutilisées dans le sachet métallique. Replier l'extrémité ouverte du sachet et sceller avec du ruban adhésif. Ranger le sachet à un endroit sec et frais. Il faut utiliser les plaques au plus tard un mois après avoir ouvert le sachet. L'exposition des plaques Petrifilm à une température de plus de 24 °C ou à une humidité de >50 % HR peut en affecter le rendement. Ne pas utiliser les plaques qui présentent une décoloration orange ou brune. Chaque sachet de plaques Petrifilm porte une date de péremption et un numéro de lot. Le numéro de lot figure aussi sur chaque pellicule.
- 6.4.5 Incuber les plaques à plat, le côté clair sur le dessus, en piles d'au plus 20 plaques. Suivre les normes en vigueur en ce qui concerne la température d'incubation. Examiner les plaques pour y déceler l'apparition d'une croissance aux jours 3 et 5.

6.5 Lecture des résultats

- 6.5.1 Effectuer le dénombrement rapidement après la période d'incubation. S'il est impossible de le faire sur-le-champ, garder les plaques dans le congélateur. Il faut toutefois éviter d'en prendre l'habitude.
- 6.5.2 Utiliser un compteur de colonies standard et, au besoin, une loupe lumineuse pour faciliter le dénombrement.
- 6.5.3 La zone de croissance circulaire a environ 30 cm². On peut effectuer des estimations lorsque les plaques contiennent plus de 150 colonies en comptant le nombre de colonies dans un ou plusieurs carrés représentatifs et en calculant la moyenne par carré. Multiplier la moyenne par 30 pour déterminer le nombre total par plaque.
- 6.5.4 Calculer le nombre de colonies par ml ou g d'échantillon à partir du nombre de colonies calculé sur des plaques choisies à des dilutions qui donnent un résultat significatif sur le plan statistique.
- 6.5.5 Lorsque l'on compte des colonies sur des plaques en double de dilutions consécutives, il faut calculer le nombre moyen de colonies par dilution avant de calculer 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 des résultats

- 6.6.1 Les colonies de levures sont bleu vert ou blanc cassé et forment de petites colonies définies. Les colonies de moisissures ont tendance à être plus étalées et diffuses que les colonies de levures. Les colonies de moisissures sont habituellement bleues, mais elles peuvent aussi avoir leur pigmentation naturelle (c.-à-d. noires, jaunes, vertes, etc.).
- 6.6.2 Des colonies très nombreuses de levures peuvent faire virer toute la zone de croissance au bleu. Des colonies très nombreuses de moisissures peuvent faire virer la zone de croissance au bleu, noir, jaune, etc. Lorsque ceci se produit, Il faut alors diluer davantage l'échantillon.

7. RÉFÉRENCES

- 7.1 AOAC. 2000. Official Method 997.02. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17thEd. AOAC International, Gaithersburg, MD. USA.
- 7.2 Betts, G. D., Betts, R. P., and Taylor, R. 1994. Evaluation of 3M Petrifilm for Aerobic Plate Count, Yeast and Mould Count and *Escherichia coli* Count. Campden Food & Drink Research Association, Chipping Campden Gloucestershire, UK.
- 7.3 Beuchat, L. R., Nail, B. V., Brackett, R. E. and Fox, T. L. 1991. Comparison of the Petrifilm Yeast and Mould Culture Film Method to Conventional Methods for Enumerating Yeasts and Moulds in Foods. J. Food Protection. **54**:443-447.
- 7.4 Beuchat, L. R., Nail, B. V., Brackett, R. E. and Fox, T. L. 1990. Evaluation of a Culture Film (Petrifilm YM) Method for Enumerating Yeasts and Moulds in Selected Dairy and High-Acid Foods. J. Food Protection. **53**:864, 869-874.
- 7.5 Knight, M.T., Newman, M.C., Benzinger, Jr., and Agin, J.R. 1994. Comparison of the Petrifilm Dry Rehydratable Film and Conventional Culture Methods for the Enumeration of Yeasts and Moulds in Foods. "AOAC International Meeting and Exposition, Abstract 23-012.
- 7.6 Knight, M.T., Newman, M.C., Benzinger, Jr., Neufang, K., Agin, J.R., McAllister, J.S., and Ramos, M. 1997. Comparison of the Petrifilm Dry Rehydratable Film and Conventional Culture Methods for the Enumeration of Yeasts and Moulds in Foods: Collaborative Study. J. AOAC International. **80**:806-823.
- 7.7 Vleamynck, G.M. 1994. Comparison of PetrifilmTM and Plate Count Methods for Enumerating Moulds and Yeasts in Cheese and Yogurt. J. Food Protection. **57**:913-914.