



**DIRECTION GÉNÉRALE DES PRODUITS DE SANTÉ ET DES ALIMENTS**

**OTTAWA**

**DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES  
DANS LES PRODUITS ET LES INGRÉDIENTS ALIMENTAIRES  
AU MOYEN DE PLAQUES DE DÉNOMBREMENT DE COLIFORMES PETRIFILM<sup>MD</sup> 3M<sup>MD</sup>**

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

**Don\_Waburton@hc-sc.gc.ca**

**1. APPLICATION**

Cette méthode s'applique au dénombrement des coliformes dans des produits et des ingrédients alimentaires. Ce produit peut aussi servir à l'échantillonnage environnemental (voir Méthode de laboratoire MFLP-41A et MFLP-41B). Cette méthode révisée remplace la méthode MFHPB-35 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. Des pellicules sont recouvertes de milieux de culture; il n'est donc pas nécessaire de préparer les milieux et des économies en main-d'œuvre et en temps sont ainsi réalisées. Il est possible de dénombrer les coliformes au moyen des plaques Petrifilm de dénombrement de coliformes (CC). On utilise des plaques de culture bactérienne contenant un milieu sec et un gélifiant hydrosoluble à froid. Des échantillons de 1 mL sont ajoutés directement sur les plaques. Une pression est appliquée sur la pellicule supérieurs avec le diffuseur en plastique afin d'étaler l'échantillon sur 20 cm<sup>2</sup>. Après avoir laissé le gélifiant se solidifier, les plaques sont ensuite incubées et dénombrées. Des études de validation et des études collaboratives ont démontré que la méthode des plaques Petrifilm CC ne diffère pas de façon significative par rapport aux méthodes traditionnelles (7.1 - 7.13, 7.15, 7.16).

**3. DÉFINITIONS**

3.1    Voir l'appendice A du volume 2.

- 3.2 Les plaques Petrifilm CC contiennent des nutriments modifiés du milieu au rouge-violet et aux sels biliaires (VRB); un gélifiant hydrosoluble à froid; et du chlorure de 2, 3, 5-triphényltétrazolium (TTC), comme indicateur.
- 3.3 Les coliformes produisent du gaz provenant de la fermentation du lactose dans le milieu. Le gaz est emprisonné par les pellicules et apparaît sous forme d'une petites bulle(s) associée à une colonie rouge sur la plaque Petrifilm CC
- 3.4 Des diffuseurs en plastique sont fournis avec les plaques Petrifilm. La face lisse et plate sert à étaler l'échantillon dans la zone de croissance.

#### 4. PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS

Voir l'appendice B du volume 2.

#### 5. MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS SPÉCIAUX

- 1) Plaques Petrifilm de dénombrement de coliformes (CC) 6410/6416 (3M Canada Inc., C.P. 5757, London (Ontario) N6A 4T1)
  - A. Plaques Petrifilm CC. Conserver à une température de 8 °C ou moins.
  - B. Diffuseur en plastique.
  - C. Feuillet d'instructions. Le « Guide d'interprétation » est disponible sur demande.
- 2) Diluants appropriés : tampon phosphate Butterfield (7.12), tampon phosphate IDF (7.14), diluant peptone-sel (méthode ISO 6887), eau peptonée tamponnée (méthode ISO 6579), eau peptonée à 0,1 %, solution saline (0,85 à 0,9%) ou eau distillée. Si un tampon au citrate est indiqué dans une méthode standard, le remplacer par un tampon phosphate Butterfield préchauffé (40 °- 45 °C).

**Note:** Ne pas utiliser de tampon au citrate ou de thiosulfate de sodium avec la méthode de plaques Petrifilm.

- 3) Appareil « stomacher », mélangeur ou l'équivalent.
- 4) Incubateur capable de maintenir une température de 32 ou 35°C.

**Note:** Il incombe à chaque laboratoire de s'assurer que les incubateurs ou les bains-marie soient maintenus à la température recommandée. Lorsqu'on recommande 35 °C dans le texte de la méthode, l'incubateur peut être à 35 +/-1,0 °C. De même, des températures plus basses de 30° ou 25° peuvent être à +/-1,0 °C. Toutefois, lorsqu'on recommande des températures plus élevées, comme 43 ou 45,5 °C, il est impératif de maintenir la température des incubateurs ou des bains-marie à +/-0,5 °C de variation. Une température plus élevée peut être létale pour les micro-organismes qu'on cherche à isoler.

- 5) pH mètre ou papier pH capable de distinguer de 0,3 à 0,5 unité pH dans l'échelle de pH 5,0 à 8,0
- 6) NaOH 1N
- 7) Compteur de colonies et/ou loupe lumineuse

#### 6. MARCHE À SUIVRE

Procéder de la façon suivante pour effectuer l'analyse :

## 6.1 Manipulation de l'échantillon d'aliment :

6.1.1 À l'exception des aliments stables à la température de la pièce, garder les échantillons au réfrigérateur (2-8 °C) ou au congélateur avant de les analyser selon la nature du produit. Faire dégeler les échantillons congelés dans un réfrigérateur ou pendant une période et à une température qui empêchent la croissance ou la mort des micro-organismes.

6.1.2 Analyser les échantillons le plus rapidement possible après leur arrivée 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

6.3.1 Pour que l'unité d'analyse soit 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 au moyen d'un diluant approprié (voir 5.2). Mélanger soigneusement.

6.3.2 Dans le cas des produits acides, ajuster le pH de l'échantillon dilué entre 6,6 et 7,2 avec du NaOH 1N.

## 6.4 Inoculation et incubation

6.4.1 Relever la pellicule supérieure et inoculer avec précaution 1 mL d'échantillon ou d'échantillon dilué au centre de la pellicule inférieure. Utiliser une pipette ou un pipetteur pour l'inoculation de l'échantillon.

6.4.2 Rabattre doucement la pellicule supérieure sur l'échantillon en évitant d'emprisonner des bulles d'air.

6.4.3 Distribuer l'échantillon également en appuyant sur le centre du diffuseur en plastique, la face plate en dessous. Ne pas faire glisser le diffuseur sur la pellicule. Laisser reposer la plaque pendant au moins une 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. Conserver le sachet dans un endroit sec et frais. Il faut utiliser les plaques au plus tard un mois après avoir l'ouverture du sachet. L'exposition des plaques Petrifilm à une température de plus de 25 °C ou à une humidité >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 dans l'industrie en ce qui concerne la température d'incubation. Incuber les plaques pendant 24 ± 2 heures. Examiner les plaques pour y déceler la présence de coliformes.

## 6.5 Lecture des résultats

6.5.1 Effectuer le dénombrement rapidement après l'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 est d'environ 20 cm<sup>2</sup>. 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 20 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 pour chaque dilution avant de calculer le nombre moyen de micro-organismes.
- 6.5.6 Pour isoler des colonies afin de les identifier avec plus de précision, relever la pellicule supérieure et prélever la colonie sur le gel.

## 6.6 Interprétation des résultats

- 6.6.1 Les colonies de coliformes seront rouges et associées à la présence de bulles de gaz à 24 heures.
- 6.6.2 Ne pas compter les colonies sur la barrière de mousse blanche parce qu'elles sont éloignées de l'influence sélective du milieu.
- 6.6.3 Les coliformes présents en grande quantité peuvent causer une ou plusieurs des situations suivantes : formation excessive de gaz, petites colonies indistinctes ou zone de croissance rouge foncé. Lorsque ces situations se produisent, diluer davantage l'échantillon afin d'obtenir un compte plus précis.

## 7. RÉFÉRENCES

- 7.1 Association Française De Normalisation (AFNOR). Validation Certificate N.:3M-01/2-09/89A. 3M Petrifilm Coliform Test. Application for the Enumeration of Coliform Colonies With and Without Gas (as Compared to VRBL Method).
- 7.2 AFNOR. Validation Certificate N.:3M-01/2-09/89B. 3M Petrifilm Coliform Test. Application for the Enumeration of Coliform Colonies With Gas (as Compared to MPN Method).
- 7.3 AFNOR. Validation Certificate N.:3M-01/2-09/89C. 3M Petrifilm Coliform Test. Application for the Enumeration of Thermotolerant Coliform Colonies With and Without Gas (as Compared to VRBL 44.5°C Method).
- 7.4 American Public Health Association. 1992. Standard Methods For the Examination of Dairy Products, 16th ed. APHA, Washington, DC. pp. 248, 251-252, 261-262.
- 7.5 American Public Health Association. 1992. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. APHA, Washington, DC. pp. 61, 80-89, 338.
- 7.6 AOAC International. 2000. Official Method 986.33. Official Methods of AOAC International. 17<sup>th</sup> ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- 7.7 AOAC International. 2000. Official Method 989.10. Official Methods of AOAC International. 17<sup>th</sup> ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- 7.8 AOAC International. 2000. Official Method 991.14. Official Methods of AOAC International. 17<sup>th</sup> ed. AOAC International. Gaithersburg, MD.
- 7.9 Baylis, C. L., C de W. Blackburn and S. B. Pettit, 1994. Evaluation of Petrifilm Plates for the Enumeration of Total Aerobic Flora, Coliforms, and *E. coli*, in Foods. Leatherhead Food RA..

- 7.10 Curiale, M. S., T. Sons, D. McIver, J. S. McAllister, B. Halsey, D. Roblee and T. L. Fox. 1991. Dry Rehydratable Film for Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Foods: Collaborative Study. J. AOAC. **74**:635-648.
- 7.11 Curiale, M. S., P. Fahey, T. L. Fox and J. S. McAllister. 1989. Dry Rehydratable Films for Enumeration of Coliforms and Aerobic Bacteria in Dairy Products: Collaborative Study. J. AOAC. **72**:312-318.
- 7.12 Food and Drug Administration. 1998. Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. Rev. A.. AOAC International, Gaithersburg, MD. 4.11, Appendix 1.10 and Appendix 3.64 (R11).
- 7.13 Ginn, R. E., V. S., Packard and R. L. Fox. 1986. Enumeration of Total Bacteria and Coliforms in Milk by Dry Rehydratable Film Methods: Collaborative Study. J. AOAC. **69**:527-531.
- 7.14 International Dairy Federation (IDF). 1996. International IDF Standard 122C:1996. Milk and Milk Products - Preparation of Samples and Dilutions for Microbiological Examination. Brussels, Belgium.
- 7.15 Matushek, M. G., M. S. Curiale, J. S. McAllister and T. L. Fox. 1992. Comparison of Various Plating Procedures for the Detection and Enumeration of Coliforms in Ice Cream and Ice Milk. J. Food Protection. **55**:113-115.
- 7.16 U.S. Department of Health and Human Services. 1999. Garde "A" Pasteurized Milk Ordinance: Recommendations of the Public Health Service. Publication No. 229. Washington, DC. US Gov't Print Office. 1999 Revision.