

**Zeitschrift:** Archives des sciences physiques et naturelles  
**Band:** 21 (1939)

**Artikel:** Peut-on appliquer la méthode dénombrement des germes de Krueger dans les recherches de bactériophagie ?  
**Autor:** Cano, Helena  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-742211>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 18.10.2024

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Peut-on appliquer la méthode de dénombrement des germes de Krueger dans les recherches de bactériophagie ?

PAR

**Helena CANO**

---

Dans de récentes publications sur la bactériophagie, A. Krueger signale qu'il emploie, pour compter le nombre des microbes d'une suspension, une méthode fondée sur la centrifugation et décrite par lui en 1930<sup>1</sup>. Le dénombrement *rapide* des germes microscopiques devient de plus en plus l'une des techniques capitales du microbiologiste. Bien que les procédés décrits soient déjà nombreux et variés, la question est loin d'être épuisée; en effet, beaucoup des techniques publiées sont insuffisamment sensibles ou nécessitent au contraire des appareils dont peu de laboratoires disposent. G. Carrisson<sup>2</sup> a mis au point, dans l'Institut où nous travaillons, une technique de dénombrement fondée sur la mesure de la lumière absorbée par une suspension microbienne; cette méthode, limitée par la sensibilité du colorimètre employé (Lange), ne permet pas de dénombrer avec exactitude des suspensions dont la concentra-

<sup>1</sup> A. P. KRUEGER, A method for the quantitative estimation of bacteria in suspensions. *J. Gen. Physiol.*, 13 (1930), 553.

<sup>2</sup> G. CARRISSON, Dénombrement rapide d'une suspension microbienne. *Archives des Sciences phys. et nat.* [5], 19 (1937), suppl. p. 86; *C. R. des séances de la Soc. de Phys. et d'Hist nat. Genève*, 54 (1937), 86.

tion est inférieure à  $7.10^{-6}$  bactéries par  $\text{cm}^3$ . Appelée dans les recherches de bactériophagie à dénombrer des suspensions nettement moins concentrées, nous avons voulu éprouver la méthode que Krueger a utilisée pour des recherches du même genre.

Cet auteur centrifuge la suspension microbienne dans des éprouvettes dont la partie basale se termine par un fin capillaire. La hauteur du sédiment déposé au cours de la centrifugation, lue au cathétomètre, est proportionnelle au nombre de bactéries que contenait la suspension centrifugée. L'évaluation absolue de ce nombre se fait une fois pour toutes, par la méthode classique des ensemencements sur vase de Petri, à la suite de dilutions appropriées.

Les éprouvettes que nous avons employées ont été préparées par la maison Werthemann-Botty, à Bâle; conformes à ceux préconisés par Krueger, ces tubes ont une longueur totale de 10 cm et un diamètre extérieur de 1,7 cm; la longueur du capillaire est de 3 cm et son diamètre interne de 0,6 mm. Le nettoyage de ces étroits cylindres après centrifugation est assez délicat; nous avons évacué le sédiment au moyen d'un brin de coton fixé au bout d'un tire-nerf de dentiste; on peut aussi utiliser une pipette de verre fine; on redoute dans ce cas la rupture de la pipette et l'obstruction définitive du capillaire. L'eau, le mélange chromique, l'eau distillée, l'alcool, l'éther sont tour à tour employés pour le lavage et le séchage du capillaire.

La première opération à faire est de déterminer le temps de centrifugation nécessaire pour obtenir, avec un même matériel, des niveaux constants de sédimentation. On réalise, dans ce but, une forte suspension de staphylocoques (souche brune) dans  $10 \text{ cm}^3$  de bouillon de viande de pH 7,2; les microbes proviennent d'une culture sur bouillon gélosé, âgée de 16 à 20 heures. Krueger recommande d'ajouter aux suspensions de faible concentration, avant de les centrifuger, le mélange suivant: acétone:  $10 \text{ cm}^3$ , NaCl M/I:  $3 \text{ cm}^3$  + formol neutre:  $2 \text{ cm}^3$ . Ce mélange favorise la floculation des protides et la sédimentation des bactéries. Deux  $\text{cm}^3$  de ce mélange de Krueger sont ajoutés à  $10 \text{ cm}^3$  de la suspension bactérienne. De cette mixture,

6 cm<sup>3</sup> sont utilisés pour la centrifugation dans un appareil effectuant 2300 tours par minute (t/min). Voici le résultat de cette opération préliminaire:

Durée de la centrifugation en minutes	Hauteur du sédiment en cm	Hauteur de la zone de transition: sédiment-liquide surnageant (cm)	Remarques
5	0,16	2,83	—
10	0,53	2,75	Liquide surnageant encore trouble
15	0,80	2,34	» » moins trouble
20	1,00	2,27	» » transparent
25	1,02	2,11	Zone de transition s'éclaircit
30	1,05	—	» » » se dissipe
35	1,02	—	» » » a disparu
40	0,99	—	—
45	0,99	—	—
50	0,99	—	—

Au début de la centrifugation on reconnaît distinctement trois zones: le liquide surnageant, une zone de transition et la colonne de sédiment proprement dit. La couche intermédiaire dont le bord inférieur est assez souvent irrégulier, disparaît au bout de 30 minutes; à partir de ce moment, les changements deviennent négligeables dans les conditions où nous travaillons. Nous avons par conséquent considéré la durée de 30 minutes comme suffisante, dans les conditions décrites, pour obtenir des résultats comparables.

La seconde opération sera de convertir les valeurs lues au cathétomètre (hauteur des sédiments en cm) en valeurs figurant le nombre de germes par cm<sup>3</sup>. L'établissement de ce titre s'effectue comme suit: disposer d'une suspension dont on a dénombré les germes; mesurer la hauteur du sédiment qu'elle fournit par centrifugation dans les conditions définies plus haut; diluer progressivement cette solution initiale et mesurer les sédiments obtenus avec chacune de ces dilutions. Connaissant la teneur en germes de la solution mère, on saura par le calcul la densité des populations des liquides dilués. Portant sur un graphique, en ordonnées les hauteurs des sédiments et

en abscisses les densités de population, on obtiendra une courbe pouvant servir d'abaque.

La *même* suspension microbienne est employée tout d'abord pour le dénombrement des germes par la méthode des triages, puis pour les centrifugations. Pour le dénombrement: introduire 3 cm<sup>3</sup> d'une forte suspension de staphylocoques bruns dans du bouillon de viande, dans un erlenmeyer contenant 27 cm<sup>3</sup> de bouillon gélatiné stérile; après mélange, prélever 3 cm<sup>3</sup> de ce dernier milieu inoculé et les ajouter, suivant les usages bactériologiques, dans un deuxième flacon à 27 cm<sup>3</sup> de bouillon gélatiné stérile; répéter cette opération de manière à réaliser les dilutions suivantes: 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup>. De chacun de ces erlenmeyers, verser 10 cm<sup>3</sup> dans un vase de Petri vide et stérile. Après étalement, puis solidification du milieu versé, conserver à la température ordinaire ces vases de Petri et dénombrer ultérieurement les colonies qui y apparaîtront. Après 3 jours à 20° l'aspect des triages a été le suivant:

10 <sup>-1</sup> : liquéfaction	10 <sup>-6</sup> : beaucoup de colonies
10 <sup>-2</sup> : id.	10 <sup>-7</sup> : id.
10 <sup>-3</sup> : id.	10 <sup>-8</sup> : quelques colonies
10 <sup>-4</sup> : liquéfaction faible	10 <sup>-9</sup> : une colonie
10 <sup>-5</sup> : id.	10 <sup>-10</sup> : pas de colonie

Les vases de Petri étiquetés 10<sup>-7</sup> sont propices à la numération des colonies. Voici les résultats de cette numération, répétée sur trois séries analogues:

Nombre des colonies observées dans 24 surfaces de 1 cm<sup>2</sup> sur le vase de Petri 10<sup>-7</sup>: 5 — 7 — 4 — 3 — 8 — 6 — 4 — 4 — 2 — 7 — 1 — 1 — 6 — 5 — 7 — 7 — 2 — 1 — 6 — 6 — 0 — 6 — 1 — 3; total 102; 102: 24 = 4,25, soit la moyenne par cm<sup>2</sup>, surface couvrant un volume de 0,3 cm<sup>3</sup> (épaisseur de la couche de milieu = 0,3 cm); le Petri contenant 10 cm<sup>3</sup> de milieu héberge en conséquence: 33,33 × 4,25 = 141,5 colonies.

Les numérations faites sur les dilutions comparables de deux autres séries donnent les chiffres suivants: 153,3 et 148,1; la moyenne de ces trois mesures est: 147,6, soit 14,76 colonies par cm<sup>3</sup> d'une dilution 10<sup>-7</sup>, soit encore 147.600.000 germes par cm<sup>3</sup> de la suspension initiale.

Dans les vases de Petri correspondant à la dilution  $10^{-8}$ , la numération des colonies peut se faire à l'œil nu; elle donne, sur plusieurs vases, 14 colonies par vase; ce chiffre, rapporté à une dilution dix fois moins forte, serait de 140, chiffre qui confirme celui fourni par la dilution  $10^{-7}$ . Nous pouvons en conséquence admettre que la suspension de départ contenait pratiquement 148 millions de germes par  $\text{cm}^3$ .

Dès que ces opérations de dénombrement par triage furent amorcées, nous effectuâmes les centrifugations signalées plus haut. En voici les résultats: centrifugation de  $6 \text{ cm}^3$  de liquide durant 30 minutes à 2300 t/min:

Dilutions	$\frac{4}{4}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{2}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{0}{4}$
100 vol. suspension initiale + 20 vol. mélange Krueger, en $\text{cm}^3$ . . . . .	6	4,5	3	1,5	0
100 vol. bouillon + 20 vol. du mélange Krueger, en $\text{cm}^3$ .	0	1,5	3	4,5	6
Hauteur du sédiment en cm	1,54	1,01	0,65	0,32	0,05

Des suspensions de staphylocoques bruns, dispersés dans les conditions sus-décrites, fournissant les sédiments signalés ci-dessous, auront les nombres de germes suivants:

cm de sédiment	Millions de microbes par $\text{cm}^3$
1,54	148
1,01	111
0,65	74
0,32	37
0,05	témoin

Ces chiffres servent à la construction d'une abaque, au moyen de laquelle il est possible d'apprécier une densité quelconque de population bactérienne jusqu'à la valeur limite de 148 millions de staphylocoques par  $\text{cm}^3$ .

Ce calibrage du dispositif expérimental étant achevé, nous avons appliqué la méthode, à titre d'épreuve, à l'étude de la

croissance d'une population microbienne. Voici l'opération: faire une suspension assez trouble de staphylocoques bruns dans 100 cm<sup>3</sup> de bouillon de viande de pH 7,2; distribuer aseptiquement la suspension à raison de 10 cm<sup>3</sup> par éprouvette; ajouter immédiatement à la première 2 cm<sup>3</sup> du mélange Krueger et prélever de cette mixture 6 cm<sup>3</sup> en vue d'une centrifugation standard; les autres éprouvettes resteront au thermostat des temps variés et croissants, avant de subir le même traitement; le tableau suivant résume l'opération et ses résultats:

Durée du séjour au thermostat 37°	Hauteur du sédiment (cm)	Millions de germes par cm <sup>3</sup>
0 h 0 m	0,13	11
1 h 30 m	0,36	41
3 h 0 m	0,59	64
5 h 30 m	1,08	113
7 h 0 m	1,26	125
8 h 30 m	1,37	132

Les essais que nous venons de relater montrent que la méthode de dénombrement *des microbes* par centrifugation peut rendre de précieux services en raison de la rapidité du procédé, mais à la condition que les suspensions à mesurer contiennent un minimum de 10 millions de germes par cm<sup>3</sup>. Au-dessous de cette concentration, l'estimation devient précaire. Cette réserve ne s'applique évidemment pas à des microorganismes plus volumineux tels que les levures ou les algues.

Nous avons cependant tenté d'appliquer cette méthode, comme Krueger l'a fait lui-même, au dénombrement des suspensions de staphylocoques en voie d'être décimés par le bactériophage spécifique. Des éprouvettes contenant 7 cm<sup>3</sup> d'une suspension de *Staphylococcus lysabillis*, suspension assez trouble pour pouvoir être dénombrée par centrifugation, sont chacune additionnées de 20 gouttes (= 1 cm<sup>3</sup>) d'un lysat actif (staphylophage). Les éprouvettes sont alors placées au thermostat à 36°, sauf la première à qui l'on ajoute 1,6 cm<sup>3</sup> du mélange Krueger

et dont ensuite on prélève 6 cm<sup>3</sup> pour la centrifugation standard. Cet échantillon fournit un sédiment de 0,3 cm de hauteur, représentant une densité de population de 33,5 millions de germes par cm<sup>3</sup>. L'éprouvette n° 2, sortie du thermostat après un séjour de 30 minutes, contient un liquide déjà éclairci par l'action du bactériophage, mais encore trouble. Soumis à la même manipulation, cet échantillon ne fournit aucun sédiment après 30 minutes de centrifugation. Une partie des germes se fixe sur les parois latérales du tube et l'autre partie, demeurée en suspension, résiste à la force centrifuge.

Cet échec renouvelé révèle deux obstacles à l'emploi de la méthode de centrifugation dans les recherches de bactériophagie; tout d'abord la pauvreté en germes de ces suspensions; puis ensuite les modifications de la tension superficielle des liquides de culture en voie de lyse; ces modifications ont été d'ailleurs observées maintes fois pour les mêmes systèmes dans d'autres circonstances techniques (stalagmométrie, par exemple).

Pour apprécier ces troubles légers nous avons alors adopté le turbidimètre de Pulfrich, qui a l'unique inconvénient d'être coûteux. Cet instrument extrêmement sensible permet des appréciations irréalisables avec des appareils du type Lange. Les expériences suivantes nous ont fourni de premiers résultats satisfaisants: préparer dans du bouillon de viande une suspension de *Staphylococcus lysabilis* et en mesurer par la méthode Krueger le nombre de germes: 40 millions par cm<sup>3</sup>. Diluer systématiquement cette suspension initiale et stabiliser immédiatement les nouvelles dispersions par une substance bactériostatique, afin d'éviter toute multiplication des germes, subséquente à la dilution. Nous avons choisi, pour opérer cette stabilisation, un antiseptique nouveau, soit le borate de phénylmercure, livré dans le commerce sous le nom de Merfen (Zyma, Nyon). Cet antiseptique a l'avantage de ne pas flocculer les germes qu'il paralyse; à la concentration de 1/500.000 ce sel inhibe la croissance des *Staphylococcus lysabilis* et ne modifie aucunement les propriétés optiques de la solution à laquelle il est ajouté. Pour préparer le liquide bactériostatique on ajoute, à 13 cm<sup>3</sup> de bouillon de viande stérile, 3 cm<sup>3</sup> d'une dilution au

dixième (aqueuse) de la solution glycérinée de Merfen (2<sup>0</sup>/<sub>00</sub>).  
Le tableau suivant résume les opérations et leurs résultats :

Dilution . . . . .	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/∞
cm <sup>3</sup> de la suspension initiale . . . . .	4	2	1	0,5	0,25	0
cm <sup>3</sup> de bouillon . .	4	6	7	7,5	7,75	8
cm <sup>3</sup> du mélange bac- tériostatique . .	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Trouble absolu au turbidimètre . .	0,0244	0,0101	0,0059	0,0037	0,0027	0,0014
Millions de germes par cm <sup>3</sup> . . . . .	20	10	5	2,5	1,25	0

Si l'on porte en ordonnées les chiffres figurant les troubles absolus mesurés au turbidimètre, et en abscisses les nombres de germes prévus par le calcul des dilutions, on dessine, en rejoignant les divers points obtenus, une courbe qui peut servir d'abaque utile à la détermination de concentrations quelconques entre les limites de 1 million de germes à 20 millions de germes par cm<sup>3</sup>. Cette estimation peut encore être rendue plus fine, car l'expérience est loin d'avoir atteint les limites de la sensibilité du turbidimètre. Ces valeurs restent vraies, pour cette méthode comme pour la précédente, tant que l'on conserve les mêmes germes, le même milieu et le même procédé de bactériostasie. Dans cette expérience, nous avons profité des mesures que nous avons établies pour calibrer les tubes à centrifuger de Krueger. Il va de soi qu'il serait plus simple et plus rigoureux d'établir la correspondance entre un degré turbidimétrique et la numération absolue par le procédé de triage classique.

*Laboratoire de Microbiologie et de Fermentation,  
Institut de Botanique générale,  
Université de Genève.*