

# **Des limites de précision de la méthode utilisant la technique des membranes filtrantes.**

## **Deuxième partie, Limites de précision de la méthode**

Autor(en): **Novel, E. / Burkard, P.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **50 (1959)**

Heft 4

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983430>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

### **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

# Des limites de précision de la méthode utilisant la technique des membranes filtrantes

Par *E. Novel* et *P. Burkard*

(Laboratoire cantonal d'analyses bactériologiques, Institut d'Hygiène, Genève)

Deuxième partie <sup>16)</sup>

## *Limites de précision de la méthode*

Nous nous sommes efforcés d'étudier, tout d'abord, du point de vue statistique et sur des séries plus ou moins grandes, la précision de la méthode dans des conditions d'expérience identiques. Nous avons donc déterminé la moyenne arithmétique la plus probable, puis vérifié dans quelles limites cette moyenne est valable, et analysé enfin les résultats afin de savoir si les séries peuvent être comparées entre elles.

Dans un deuxième paragraphe nous avons examiné la question de la concordance des résultats obtenus sur membranes filtrantes et de ceux obtenus par les méthodes habituelles (par exemple sur plaque de Pétriensemencée par «spreading» ou en milieu lactosé liquide: nombre le plus probable des auteurs américains).

Enfin nous avons défini au moyen de cultures pures et sur différents milieux dans quelles limites le nombre des colonies comptées sur membranes filtrantes correspondait à la réalité, en d'autres termes nous avons défini la limite inférieure et la limite supérieure entre lesquelles le nombre des colonies décelées pouvait entrer en ligne de compte en vue d'une expression mathématique.

Il nous a semblé enfin intéressant d'étudier la question des dilutions pour des eaux très polluées.

### Moyenne arithmétique de séries identiques, erreurs probables

Nous avons emprunté toutes les données statistiques employées dans ce paragraphe à *Novel* <sup>1)</sup>, qui fait appel principalement aux formules de *Halvorson* et *Ziegler* <sup>2)</sup>.

La méthode de ces auteurs est fondée sur le principe des moindres carrés et les formules suivantes permettent de juger la valeur d'une série, ou de comparer des séries entre elles.

Il convient d'ajouter que nous nous sommes efforcés de restreindre les causes d'erreurs d'origine technique en prenant les précautions suivantes:

- a) La mesure des volumes filtrés (généralement 2 cm<sup>3</sup>) est faite au moyen d'une seringue automatique, maniée de la même façon, et par le même expérimentateur. Si le volume mesuré n'est peut-être pas très précis, du moins peut-on prétendre que les écarts de volumes dans une suite d'expériences doivent être faibles.

- b) La suspension microbienne est maintenue à la température de la glace fondante (la température de la suspension est d'environ 4° C) et est agitée avant chaque prélèvement, de manière à répartir d'une façon aussi uniforme que possible les germes microbiens.
- c) Etant donné le faible volume filtré, on porte préalablement dans l'entonnoir de l'appareil 20 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique stérile. En introduisant ensuite le volume de la suspension microbienne et en attendant une minute environ avant de filtrer sous un vide peu poussé, il nous a été possible d'obtenir une bonne répartition des germes dans le liquide, comme en font foi les membranes filtrantes après incubation.
- d) La numération a toujours été effectuée par la même personne, les colonies déjà recensées étant «biffées» au moyen d'un fil de platine dur.
- e) La suspension, ou plus exactement, les suspensions utilisées ont été préparées comme nous l'avons déjà mentionné dans la première partie de notre travail; l'incubation des membranes filtrantes, sur milieu Endo Difco, a duré 20 h. à 37° C.

Les formules suivantes de *Halvorson et Ziegler* <sup>2)</sup> peuvent être utilisées pour juger la valeur de séries faites dans les mêmes conditions:

$$s^2 = \frac{\sum (x-m')^2}{n}$$

$$C^2 = s^2 - (m-m')^2$$

$$m = \frac{\sum x}{n} = m' + \frac{\sum (x-m')}{n}$$

$$V = \frac{100 - c}{\text{moyenne}}$$

$$C_m = \frac{C}{\sqrt{n}}$$

- x = nombre de colonies par M. F.  
 m = moyenne arithmétique à déterminer  
 m' = chiffre choisi arbitrairement parmi les nombres de colonies comptées; en pratique on choisit un chiffre qui, en première approximation, n'est pas trop éloigné de la moyenne.  
 s<sup>2</sup> = somme des carrés des écarts  
 C = écart-étalon, ou déviation standard. Met en évidence la régularité ou l'irrégularité des séries semblables, indépendamment de la nature des phénomènes étudiés, qui peuvent, eux, varier sous l'influence de causes impondérables.  
 V = coefficient de variation = écart étalon exprimé en %.  
 C<sub>m</sub> = déviation standard moyenne.  
 n = nombre de membranes comptées.

*Exemple de calcul* soit la série suivante:

92-~~107~~-100-84-89-84-88-87-105-99-~~81~~-95-  
 94-91-92-93-102-94-91-97-99-99-106-96

Termes extrêmes: 107 et 81

Moyenne des termes extrêmes:  $\frac{107 + 81}{2} = 94$

Le terme 94 apparaissant dans la série, nous pouvons le choisir comme moyenne arbitraire donc m' = 94.



Pour la suite des calculs nous devons connaître les termes  $(x-m')$  et  $(x-m')^2$ . Ces termes seront calculés sous formes de tableau.

*Calculs des différentes caractéristiques de la première série*

x	$(x-m')$		$(x-m')^2$	
92		- 2	4	$(x-m') = 9 \quad (x-m')^2 = 1129$
107	+ 13		169	
100	+ 6		36	
84		- 10	100	$m = m' + \frac{\Sigma (x-m')}{n} = 94 + \frac{9}{24} = 94,37$
89		- 5	25	$m = 94,37$
84		- 10	100	
88		- 6	36	
87		- 7	49	
105	+ 11		121	<i>écart étalon:</i> $C^2 = s^2 - (m-m')^2$
99	+ 5		25	mais $s^2 = \frac{\Sigma (x-m')^2}{n} = \frac{1129}{24} = 47,04$
81		- 13	169	$C^2 = 47,04 - (94,37 - 94)^2 = 47,04 - 0,14 = 46,90$
95	+ 1		1	$C = \approx 6,85$
94				
91		- 3	9	$V = \frac{100 \cdot 6,85}{94,37} = 7,26 \%$
92		- 2	4	
93		- 1	1	
102	+ 8		64	$C_m = \frac{c}{\sqrt{n}} = \frac{6,85}{\sqrt{24}} = 1,4$
94				
91		- 3	9	
97	+ 3		9	
99	+ 5		25	
99	+ 5		25	
106	+ 12		144	
96	+ 2		4	
	+ 71	- 62	1129	

Nous avons groupé dans le tableau 6 des résultats obtenus avec différentes séries, respectivement de 24,8 et 4 termes, séries effectuées avec une suspension d'E. coli 20994. Seules les séries de 4 termes sont utilisées en pratique courante, ce nombre étant, d'après *Novel*<sup>1)</sup>, suffisant pour obtenir une précision acceptable.

Les séries du tableau 6 n'ont pas toutes la même valeur du point de vue statistique. En effet les 3 séries à 24 termes et les 3 séries à 8 termes n'ont pas été faites au même moment. En revanche les manipulations sont identiques pour chaque série.

Les 3 séries à 4 termes sont comparables en tous points, en ce qui concerne l'influence des facteurs extérieurs, ayant été faites au même moment, au cours d'une même expérience, avec des volumes identiques d'une même suspension microbienne et avec les mêmes manipulations.

Il nous a paru intéressant de noter encore les résultats des séries de 4 termes choisies afin de démontrer la concordance éventuelle des séries dont certains facteurs externes sont différents:

*Tableau 6*  
*Caractéristiques de quelques séries obtenues par filtration sur membranes filtrantes*

n	Moyenne approxim. m'	$\Sigma (x-m')$	$\Sigma (x-m')^2$	Moyenne m	écart étalon C	coeffic. de variation V	Déviat. standard moyenne Cm	$\pm 2 Cm$
24	92-107-100-84-89-84-88-87-105-99-81-95-94-91-92-93-102-94-91-97-99-99-106-96							
	94	+ 9	1129	94,37	6,85	7,26 %	1,4	$\pm 2,8$
24	152-136-152-137-153-144-149-136-136-153-144-141-156-138-131-136-135-134-140-141-141-137-133-156							
	144	- 45	1507	142,13	7,71	5,42 %	1,57	$\pm 3,14$
24	52-48-52-60-68-51-53-51-62-56-57-65-59-54-55-56-51-50-55-65-68-47-51-53							
	52	+ 93	1201	55,87	5,92	10,75 %	1,21	$\pm 2,42$
8	50-59-52-64-50-48-57-52							
	52	+ 16	218	54	4,82	8,94 %	1,7	$\pm 3,4$
8	116-127-118-122-121-125-115-101							
	116	+ 17	493	118,12	7,56	4,17 %	2,68	$\pm 5,36$
8	210-217-227-197-220-207-197-221							
	210	+ 16	906	212	10,6	5 %	3,75	$\pm 7,5$
4	250-233-248-267							
	250	- 2	582	249,5	12,03	4,83 %	6,01	$\pm 12,02$
4	258-258-265-242							
	258	- 9	305	255,75	8,43	3,3 %	4,21	$\pm 8,42$
4	264-236-251-256							
	251	+ 3	419	251,75	10,21	4,06 %	5,1	$\pm 10,2$

- a) *Tableau 7*: séries comparables quant aux manipulations, mais différentes par
- les volumes filtrés de suspension monomicrobienne
  - la dilution de cette suspension
  - le moment où ont été effectuées ces séries.

Ces séries seraient donc comparables aux séries de 24 et 8 termes du tableau 6. Elles reflètent d'autre part assez bien la pratique courante, bien que le matériel ne soit pas polymicrobien.

- b) *Tableau 8*: séries comparables en tous points, sauf pour le volume filtré, donc pour la richesse microbienne. Ces séries ont été effectuées pour fixer les limites supérieure et inférieure admissibles lors de la numération des colonies microbiennes sur membranes filtrantes.

Nous avons naturellement choisi uniquement les valeurs situées graphiquement sur une droite.

*Tableau 7*

No de la suspension microbienne	m'	$\Sigma (x-m')$	$\Sigma (x-m')^2$	$m$	C	V	Cm	$\pm 2 Cm$
I	14-12-11-10							
	12	- 1	9	11,75	1,48	12,6 %	0,74	$\pm 1,48$
II	47-63-62-54							
	54	+ 10	194	56,5	6,5	11,5 %	3,25	$\pm 6,5$
III	87-102-103-113							
	102	- 3	347	101,25	9,28	9,18 %	4,64	$\pm 9,28$
IV	176-151-161-167							
	161	11	361	163,75	9,1	5,57 %	4,55	$\pm 9,1$
V	111-116-121-130							
	121	- 6	206	119,5	7,02	5,78 %	3,51	$\pm 7,02$



Tableau 8

Nombre cc filtrés suspension idem	m'	$\Sigma (x-m')$	$\Sigma (x-m')^2$	m	C	V	Cm	$\pm 2 Cm$
0,5 cc	60-67-67-62							
	62	+ 8	54	64	3,08	4,82 %	1,54	$\pm 3,08$
1,0 cc	122-116-127-118							
	122	- 5	77	120,75	4,2	3,29 %	2,1	$\pm 4,2$
1,5 cc	176-178-185-197							
	185	- 4	274	184	8,22	4,46 %	4,11	$\pm 8,22$
2,0 cc	247-271-270-239							
	247	+ 39	1169	256,75	14,04	5,47 %	7,02	$\pm 14,04$
2,5 cc	320-313-314-316							
	320	- 1	29	315,75	7,20	2,28 %	3,6	$\pm 7,2$

### Conclusions

Il convient, en essayant de tirer des conclusions des données statistiques ci-dessus, de considérer les trois cas suivants:

- a) séries en tous points semblables (méthode, densité microbienne, temps): cf. tableau 6, séries de 4 termes. Les trois séries étudiées peuvent être comparées entre elles, puisque l'écart étalon varie relativement peu: de 8,43 à 12,03 (soit de 3,3 à 4,83 %).
- b) séries de 24 et 8 termes, dissemblables par la concentration microbienne et par le moment où elles ont été effectuées: elles donnent de bons résultats mais sont inutilisables en pratique du fait du grand nombre de manipulations qu'elles comportent, de la mobilisation d'un matériel important et enfin de la quantité appréciable de milieu et de membranes qu'elles exigent, sans parler du temps considérable qu'elles demandent.
- c) séries de 4 termes, dissemblables soit par la seule concentration soit par leur concentration et le moment où elles ont été effectuées. Les fluctuations dans les deux cas sont acceptables (tableau 7 et 8). Il y a même lieu de remarquer que les résultats sont meilleurs que ceux obtenus sur plaques de Pétri, tels que les a notés *Novel* <sup>1)</sup> (tableau 9).

*Tableau 9*  
*Fluctuation de séries de 4 termes*

Sur plaques de Pétri Novel <sup>1)</sup>		Sur membranes filtrantes	
Ecart étalon C	coefficient de variation V	Ecart d'étalon C	coefficient de variation V
7,9 - 21,8 2,2 - 4,7	5,9 - 17,2 % 19,5 - 41,7 %	1,48 - 9,28 3,08 - 14,04	5,57 - 12,6 % 2,28 - 5,47 %

En résumé, et ceci naturellement dans le cadre de nos expériences (faites principalement avec un matériel monomicrobien), la méthode des membranes filtrantes donne des résultats reproductibles.

### Comparaison entre les résultats fournis d'une part par les membranes filtrantes et d'autre part par les méthodes habituelles

Cette étude, effectuée pour les membranes filtrantes sur milieu Endo Difco avec une suspension monomicrobienne (*E. coli* 20994), a été conduite dans le but de savoir si les résultats obtenus sur membranes filtrantes correspondent à ceux obtenus par les méthodes habituelles de numération des germes.

#### *Méthode des dilutions*

Une suspension d'*E. coli* 20994 (culture de 16 heures à 37° dans 5 cm<sup>3</sup> de bouillon Difco) est diluée jusqu'à 10<sup>-8</sup> dans de l'eau physiologique en employant pour chaque dilution successive au 1/10 une nouvelle pipette, rincée 3 fois au moment du prélèvement et 5 fois au moment de l'homogénéisation. Les dilutions se font par prélèvement de 0,5 cm<sup>3</sup> et l'homogénéisation de cette prise dans 4,5 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique.

On porte 0,1 cm<sup>3</sup> des dilutions 10<sup>-7</sup> et 10<sup>-6</sup>, respectivement, sur la gélose répartie en boîtes de Pétri de 9 cm<sup>3</sup> de diamètre, gélose ayant été séchée préalablement pendant 4 heures à l'étuve à 37°. On procède ensuite à un étalement par «spreading» au moyen d'un petit étaleur stérilisé jusqu'à obtention d'une surface sèche (l'étaleur doit avoir tendance à adhérer à la surface de la gélose). Nous avons employé cette méthode de numération de préférence à la méthode d'inclusion des germes en gélose fondue et refroidie à 50° environ, car cette première méthode permet a) une lecture au bout de 24 heures b) une répartition des germes excellente. Les résultats sont valables quantitativement.

Pour les membranes filtrantes, on part de la dilution 10<sup>-4</sup> ou 10<sup>-5</sup> que l'on porte dans un volume donné d'eau physiologique, puis l'on filtre également un volume connu de cette suspension. Nous indiquerons pour chaque cas et la dilution précise et le volume filtré.

Résultats voir tableau 10.



Tableau 10

Les résultats sur membranes filtrantes sont-ils en rapport avec la quantité de germes contenue dans la suspension filtrée ?

Série No	Dilutions	Numération	moyenne	concentration calculée des dilutions			concent. suspens. départ
				10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-4</sup>	
I Pétri	10 <sup>-7</sup>	9-7-9-6	7,7	770	77	77 000	7,7.10 <sup>7</sup>
Pétri	10 <sup>-6</sup>	83-79-85-62	77	770	77		7,7.10 <sup>7</sup>
M. F.	1 cc dil. 10 <sup>-4</sup> ds 800 cc	94-84-98-81 filtration 1 cc	89			71 200	7,12.10 <sup>7</sup>
II Pétri	10 <sup>-7</sup>	10-6-8-11	8,7	870	87	87 000	8,7.10 <sup>7</sup>
Pétri	10 <sup>-6</sup>	79-65-80-87	78	780	78	78 000	7,8.10 <sup>7</sup>
M. F.	0,5 cc dil. 10 <sup>-5</sup> ds 400 cc	114-104-111-110 filtration 4 x 10 cc	110			88 000	8,8.10 <sup>7</sup>

Filtration sur membranes et numération directe sur gélose par étalement en boîtes de Pétri ou par dispersion dans de la gélose fondue: étude de l'éventuel effet inhibiteur des membranes

Nous avons déjà constaté dans un chapitre précédent que les filtrations sur membranes d'une même suspension microbienne donnaient des résultats pratiquement identiques, que les membranes soient incubées sur gélose simple ou sur des milieux sélectifs, tels que le milieu d'*Endo* ou la gélose lactosée au chlorure de triphényl-tétrazolium + Tergitol 7.

Cependant cette constatation n'a de valeur pratique que si les membranes elles-mêmes sont sans influence sur les résultats, c'est-à-dire que si l'effet inhibiteur des membranes sur les germes déposés à leur surface est nul.

Dans ce but nous avons, à partir d'un volume donné d'une même suspension microbienne (*E. coli*), d'une part filtré sur membrane filtrante et, d'autre part, réparti sur gélose simple en boîtes de Pétri, soit par «spreading» soit par incorporation dans la gélose.

Les résultats sont collationnés dans le tableau 11.

Les résultats collationnés dans les tableau 10 et 11 montrent que les membranes filtrantes permettent de retrouver un nombre de germes comparables à celui obtenu par les méthodes d'ensemencement de la gélose simple. Les résultats certes, en particulier dans le tableau 10, présentent des différences, qui n'excèdent cependant pas, croyons-nous, les limites de précision de telles méthodes. N'oublions pas en effet que nous diluons 7 fois de suite au 1/10 la suspension de départ, augmentant ainsi les causes possibles d'erreur.

Tableau 11

Effet inhibiteur éventuel des membranes filtrantes sur la croissance des germes

Expér. No	Sur gélose par spreading (Pétri de 14 cm de Ø)	Sur Endo Difco M. F.
I 0,5 cc	21-30-22-20 Moyenne = 24	16-26-19-24 M = 21
II 0,5 cc	49-45-41-40-44 M = 44	40-43-40-42 M = 41
III 0,5 cc	42-39-39-43 M = 41	37-34-35-32 M = 35
	Par incorporation dans de la gélose à 50 <sup>o</sup>	Sur Endo Difco M. F.
I 1 cc	51-50-48-57 M = 51	54-57-50-48 M = 52
II 1 cc	22-27-37-25 M = 28	27-29-31-34 M = 30

Nous pouvons donc conclure que les résultats obtenus par les deux méthodes sont comparables, en d'autres termes que les filtres membranes n'ont pas d'effet inhibiteur sur les germes déposés à leur surface (tout au moins pour *E. coli*).

Nous ne prétendons cependant pas que les chiffres obtenus soient le reflet exact de la concentration initiale microbienne. Ces expériences prouvent uniquement que les erreurs, si erreurs il y a, sont les mêmes dans les deux méthodes.

### Comparaison avec le «nombre le plus probable» (MPN)

Le nombre le plus probable de bactéries fermentant à 37° le lactose avec dégagement de gaz (les coliformes principalement) a été introduit par *McGrady* en 1915<sup>3)</sup> Cette méthode, employée en Amérique du Nord surtout, repose sur la fermentation du lactose avec dégagement de gaz par la plupart des coliformes. On ensemence, avec des volumes choisis de l'eau à analyser, des séries plus ou moins grandes de tubes de bouillon lactosé. Le résultat le plus précis est naturellement obtenu avec une série infinie. En pratique on se contente de séries de 5 tubes, ensemencés avec par exemple 3 dilutions ( $5 \times 10 \text{ cm}^3$ ;  $5 \times 1 \text{ cm}^3$  et  $5 \times 0,1 \text{ cm}^3$ ). Le calcul des probabilités a permis de dresser les tables dont on se sert habituellement. *McCarthy*, *Thomas* et *Delaney*<sup>4)</sup> font remarquer que les tables seront différentes selon le système statistique employé pour les calculer.

Des études mathématiques critiques ont incité certains auteurs, en particulier *Wodward*<sup>5)</sup> à introduire des chiffres limites entre lesquels le MPN est sûrement compris dans 95 % des cas.

L'introduction des membranes filtrantes a permis à de nombreux auteurs de comparer les résultats obtenus sur membranes filtrantes et ceux donnés par les méthodes officielles (par exemple bouillon lactosé: MPN). *Kapler*<sup>6)</sup> note que 26 % des résultats ne sont pas concordants. Il émet l'hypothèse d'une numération d'espèces bactériennes différentes; d'autre part le fait d'utiliser un matériel polymicrobien, dont on ne peut connaître préalablement le pourcentage respectif des individus des diverses espèces en présence, ne permet pas d'obtenir une parfaite concordance.



*Broscheit* <sup>7)</sup> et *Broscheit et Zimmermann* <sup>8)</sup> rapportent que sur 200 échantillons d'eau analysés, 73,5 % des résultats sont identiques, soit par la méthode du bouillon lactosé, soit par la méthode des membranes filtrantes. Dans 16,5 % des cas le titrage donna de meilleurs résultats, la filtration dans 10 %. *Adams* <sup>6)</sup>, étudiant d'une part les résultats sur membranes filtrantes et d'autre part les résultats obtenus avec le bouillon «lauryl sulfate tryptose» avec tests confirmatifs sur bouillon «2 % brillant green bile» et «Eosine methylene blue agar», constate que – pour une eau de rivière brute, non traitée – sur 219 analyses et en appliquant les limites extrêmes entre lesquelles le MPN se trouve à coup sûr dans 95 % des cas, 83,5 % des résultats concordent, 10,1 % des résultats sont plus élevés sur les membranes filtrantes et 6,4 % sont plus faibles. Pour une eau chlorée, les résultats concordants représentent les 88,4 %. *Agnese* <sup>10)</sup> employant le milieu au chlorure de triphenyl-tétrazolium + tergitol 7 note que la filtration sur membranes filtrantes fournit un taux colimétrique une fois et demi plus élevé que le taux obtenu avec le bouillon lactosé. *Lang* <sup>12)</sup> étudiant les avantages et les inconvénients des méthodes recommande les membranes filtrantes pour les eaux pauvres – dont on connaît approximativement la concentration – alors que pour les eaux riches les méthodes habituelles seraient, d'après cet auteur, plus adéquates. *Conner* <sup>13)</sup> recommande, en revanche, les membranes filtrantes pour toutes les analyses colimétriques. *Thomas et Woodward* <sup>14)</sup> notent, quels que soient les échantillons d'eau analysés, une précision pour les M.F. de 2 à 5 fois supérieure aux autres méthodes.

Pour simplifier à l'extrême le problème, nous avons fait une étude comparative avec une suspension monomicrobienne diluée d'E. coli.

Cette suspension est, d'une part, filtrée sur M.F. (4 fois 10 cm<sup>3</sup>) et, d'autre part, répartie dans des tubes de bouillon lactosé suivant le tableau ci-dessous (le bouillon lactosé est concentré pour les quantités d'eau supérieures à 1 cm<sup>3</sup>). Les membranes filtrantes sont disposées sur milieu Endo Difco et portées à l'étuve à 37° pendant 20 heures. Les tubes sont incubés durant 48 heures à 37°. Sont considérés comme positifs les tubes montrant un dégagement de gaz (tubes munis d'une petite éprouvette renversée), après un séjour de 48 heures à 37°.

### Conclusions

De ces quelques expériences, peu nombreuses il est vrai, il ressort cependant que, pour une suspension monomicrobienne, la concordance entre les résultats sur membranes filtrantes et le MPN n'existe pas. En prenant en revanche comme base le «95 % confidence limit» la concordance est meilleure. Il est remarquable cependant que dans les expériences 12 et 13 par exemple, effectuées avec deux dilutions d'une même suspension microbienne, les résultats soient dans un rapport de 1 à 10 pour les M.F., ce qui correspond au schéma des dilutions, alors que les «MPN» sont respectivement 130 et 240, soit sensiblement dans un rapport de 1 à 2. D'autre part, en considérant les expériences 10 (1200 germes/100 cm<sup>3</sup>) – 12 (1250/100 cm<sup>3</sup>) et 14 (1270/100 cm<sup>3</sup>) il ressort que nous avons à peu près,



en utilisant la méthode des membranes filtrantes, la même concentration microbienne; les MPN sont respectivement 920-240-2400 (ou plus). Ces derniers chiffres ne semblent pas devoir définir des concentrations microbiennes presque identiques. Il est également intéressant de constater (exp. 10 et 11) qu'à un MPN identique (920) ne correspondent pas des résultats superposables avec les membranes filtrantes (1200-1610).

Pour conclure, nous estimons que les membranes filtrantes donnent des résultats plus précis et certainement plus rapprochés de la réalité. Mais cette conclusion, il est important de la souligner, n'est valable en pratique courante (milieu polymicrobien) qu'à la condition que l'aspect macroscopique des colonies de coliformes sur membranes filtrantes soit facilement reconnaissable. Il est incontestable qu'avec le bouillon lactosé, on démontre la présence dans une eau de tous les germes des diverses espèces qui sont susceptibles de faire fermenter le lactose *avec* dégagement de gaz. Sur membranes filtrantes, avec un milieu permettant sans défaillance de mettre en évidence la fermentation du lactose, la restriction de la formation de gaz est déjà supprimée. Notons encore que tous les coliformes lactose négatifs – et de nombreux auteurs leurs attachent une importance dans la classification d'une eau – échappent aussi bien, à l'examen macroscopique direct, à l'une et à l'autre des méthodes. Les membranes filtrantes permettent cependant d'étudier facilement les caractères de toutes les colonies visibles.

### Combien de colonies microbiennes peut-on compter avec précision sur une membrane filtrante ?

Cette question, très importante, n'a pas été véritablement étudiée, du moins à notre connaissance. Les chiffres indiqués dans la littérature oscillent entre 20 et 300 (*Clark et Kabler*<sup>15</sup>: de 50-300) sans qu'il soit fait mention d'expériences tendant à fixer les limites inférieures et supérieures. Cette étude est en étroit rapport d'une part avec l'espèce microbienne et d'autre part avec le milieu employé, en dehors de facteurs qu'il convient également de fixer, tels la température et la durée d'incubation. Nous avons utilisé deux milieux: le milieu d'Endo Difco et le milieu au chlorure de triphényl-tétrazolium + tergitol 7. En effet ces deux milieux semblent actuellement les mieux appropriés à la colimétrie de l'eau sur membranes filtrantes. Comme souches nous avons pris d'une part *E. coli* 20994, germe donnant des colonies de grandeur moyenne et qui est pratiquement, encore actuellement, le microorganisme le plus recherché dans les différentes méthodes d'analyse colimétrique, et d'autre par *Klebsiella aerogenes* (*Aerobacter aerogenes*), dont les colonies atteignent d'assez grandes dimensions sur M.F. et qui ont facilement tendance à confluer, lorsqu'elles sont trop rapprochées les unes des autres.

Nous partons dans chaque cas d'une suspension monomicrobienne dans de l'eau physiologique maintenue à 4° environ. Les volumes sont mesurés avec une

*Tableau 12*  
*Comparaison des résultats obtenus sur M.F et avec le bouillon lactosé pour E.coli*

No sus-pension	Membranes filtrantes		Tubes bouillon lactosé											M.P.N.	95 % confidence limite	
	moyenne 4 filtra-tions de 10 cc	nombre germes pour 100 cc	ensemencem. 10 cc		2 cc		1 cc		0,2 cc		0,1 cc		nombre de germes 100 cc lim. R. 1			
			n. tubes ensemences	+ tubes	tubes ens.	+ tubes	tubes ens.	+ tubes	tubes ens.	+ tubes	tubes ens.	+ tubes				
1	49	490			5	5			5	1			100-200			
2	409	4090			5	5			5	5			500 au min.			
3	43	430			5	5			5	1			100-200			
4	133	1330			5	5			5	3			300-400			
5	323	3230			5	5			5	5			500 au min.			
6	27	270						10	8				80-90			
7	14	140						10	6				60-70			
8	329	3290			5	5			5	5			500 au min.			
9	57	570	5	5				5	2			5	0	40-60	49	17-126
10	120	1200	5	5				5	5			5	3	600-800	920	210-3000
11	161	1610	5	5				5	5			5	3	600-800	920	210-3000
12	128	1280	5	5				5	5			5	0		240	65-740
13	13	130	5	5				5	4			5	0	80-100	130	35-360
14	127	1270	5	5				5	5			5	5	1000-?	> 2400	800-∞
15	12	120	5	5				5	1			5	1	?	46	12-130

R 1: exemple de calcul: série 5 tubes 10 cc + 5 tubes 1 cc + 3 tubes 0,1 cc +  
 Résultat compris entre au minimum 3 germes pour 0,5 cc = 600 germes/100 cc  
 et au maximum 4 germes pour 0,5 cc = 800 germes/100 cc donc de 600 à 800.

seringue automatique réglée pour le volume le plus faible. Les volumes supérieurs sont généralement des multiples de ce volume initial, mesuré en actionnant le nombre de fois nécessaires la seringue. Ainsi nous ne mesurons probablement pas des volumes initiaux tout à fait précis, mais du moins les volumes sont dans des rapports simples dans lesquels les erreurs doivent être minimales (4 filtrations pour chaque volume).

*Avec une suspension d'Escherichia coli 20994*

sur milieu d'Endo Difco, figure 13: toutes les courbes passent par l'origine, donc théoriquement pas de limite inférieure. Cependant les erreurs en-dessous de 20 colonies sont assez élevées.

Limite supérieure: environ 300 colonies.

sur milieu TTC + tergitol 7, figure 14: limites entre 20 et 240 colonies.

*Avec une suspension de Klebsiella aerogenes*

sur milieu Endo: des trois courbes effectuées, deux sont pratiquement identiques: limite supérieure entre 60 et 70 (courbe no 1 et 2) alors que la troisième courbe a une limite supérieure de 40 germes par membrane. Ces résultats très faibles proviennent de la tendance qu'ont les colonies à confluer entre elles, rendant toute lecture précise impossible (figure 15).

sur milieu TTC + tergitol 7: la limite supérieure se situe également autour de 40 colonies par membrane filtrante de 48 mm de  $\phi$  (figure 16).

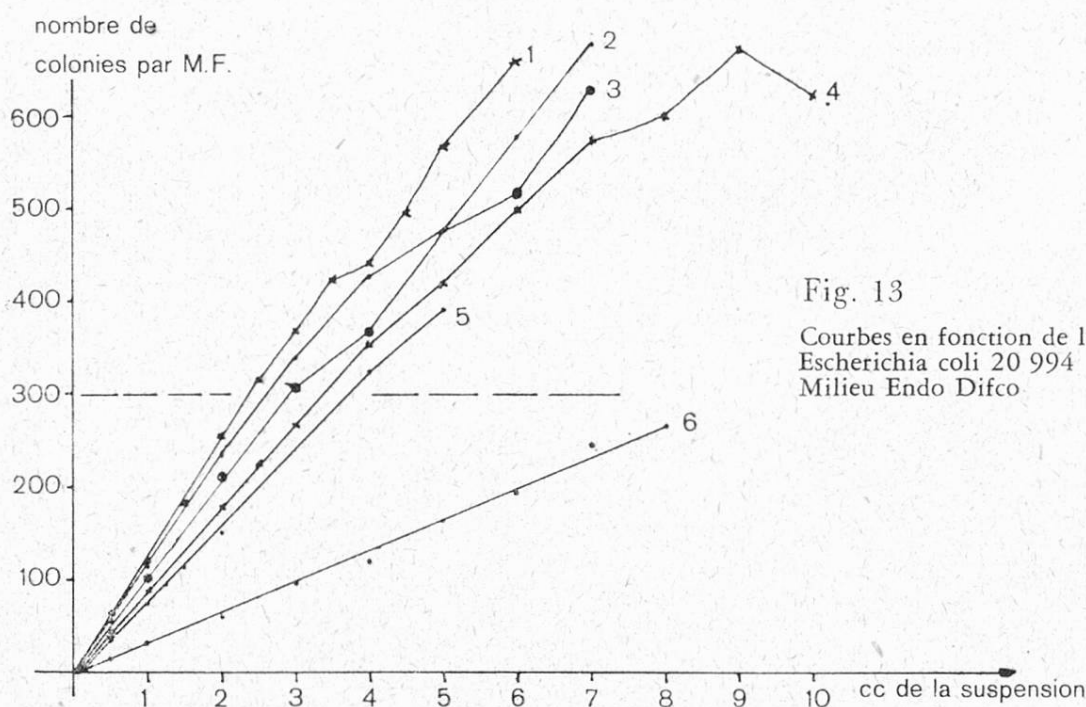
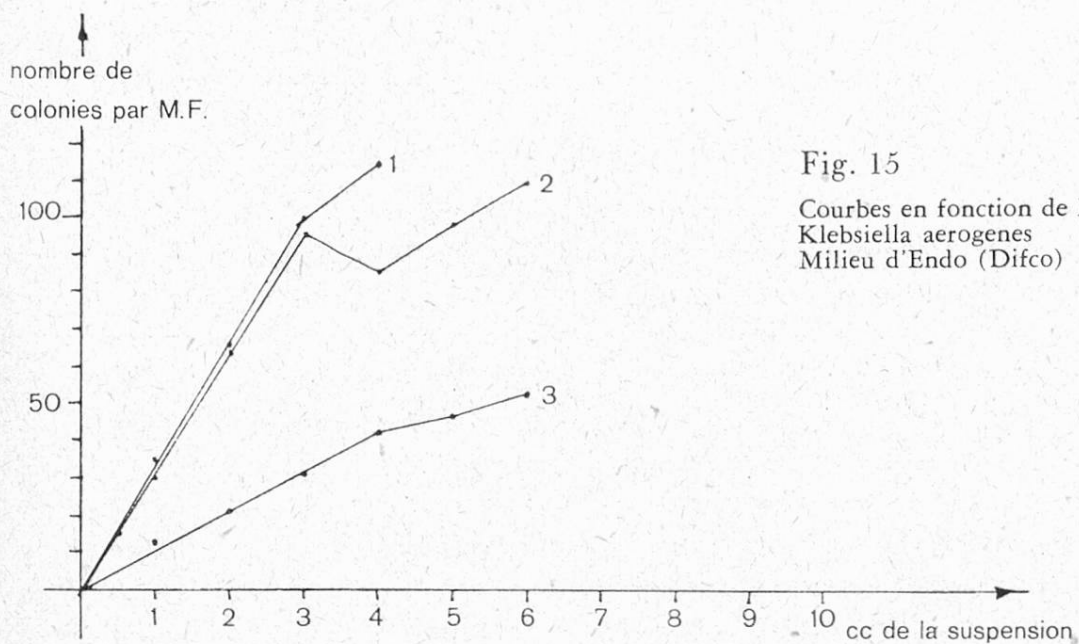
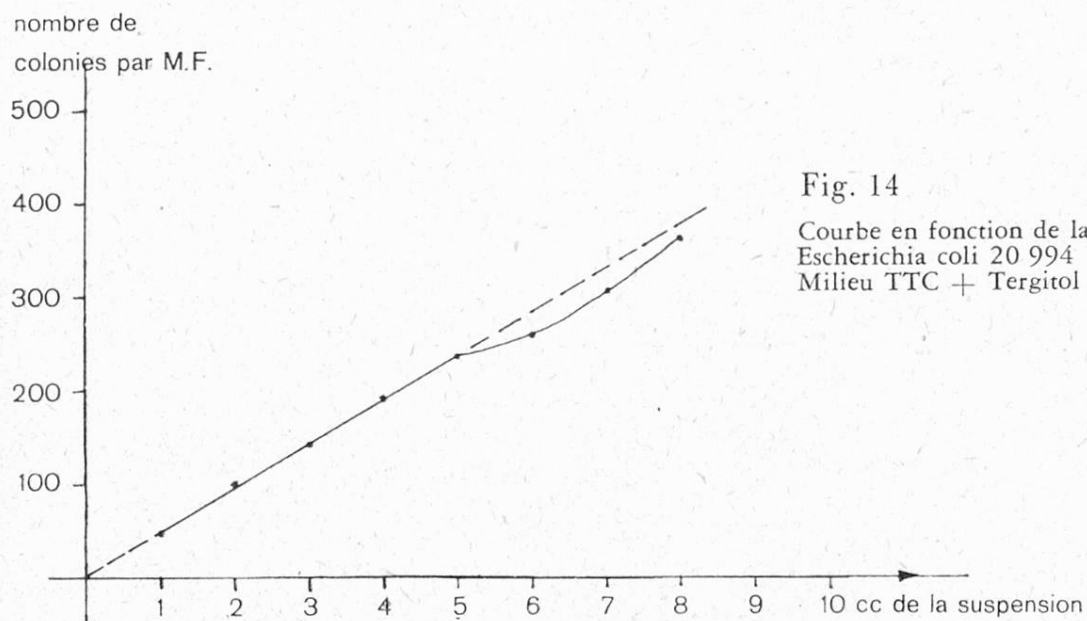
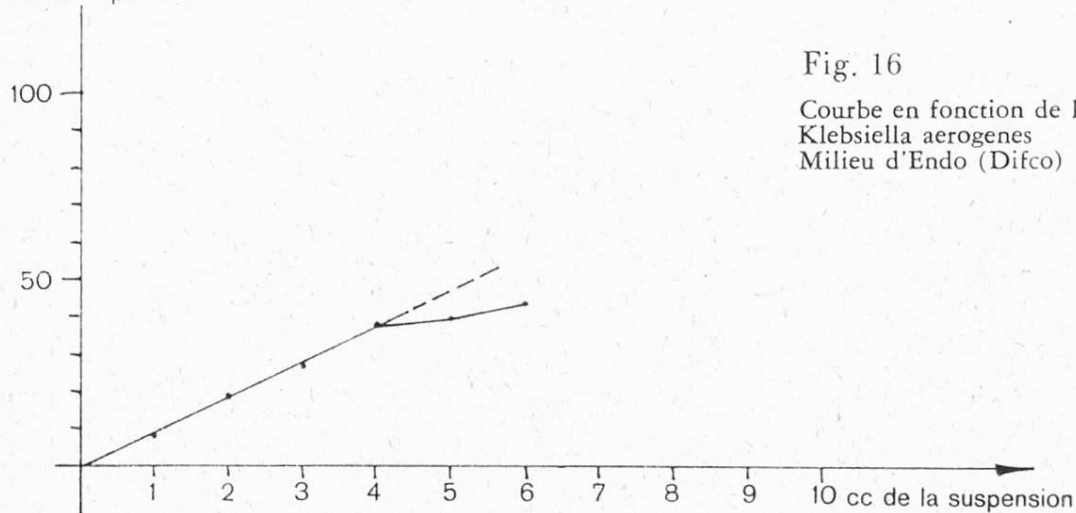


Fig. 13  
 Courbes en fonction de la concentration  
 Escherichia coli 20 994  
 Milieu Endo Difco





nombre de colonies par M.F.



### Conclusions

Pour une température de 37° et une durée d'incubation de 20 à 22 heures, les limites supérieures varient en fonction de l'espèce microbienne et, pour une moindre part, du milieu (uniquement milieu Endo + tergitol 7).

Pour *Klebsiella aerogenes* les limites sont, pour les deux milieux, de 10 à 40 germes par M.F.

Pour *E. coli*, sur milieu d'Endo de 20 à 300; sur milieu TTC+tergitol de 20 à 240 germes.

### Dilution d'eaux très polluées pour filtration sur M.F.

Lorsque l'on désire analyser une eau très riche en germes, il est absolument nécessaire de la diluer, ou alors d'en utiliser de très faibles volumes. Nous avons vu, dans des paragraphes précédents, qu'il est parfaitement possible de filtrer sur membranes filtrantes des volumes de 1 cm<sup>3</sup>, voire de 0,5 cm<sup>3</sup>, simplement en prenant la précaution d'introduire dans l'entonnoir de l'appareil environ 20 cm<sup>3</sup> d'eau physiologique stérile avant de mesurer le volume d'eau à analyser.

Nous avons également étudié la concordance de la concentration en germes de différentes dilutions au 1/10 d'un matériel monomicrobien.

Nous pouvons donc, en nous inspirant des résultats antérieurs, envisager deux méthodes pour l'analyse d'eaux très polluées:

- a) par mesure directe de volumes faibles
- b) après dilution.

#### a) Par mesure directe de volumes faibles

Cette méthode a certainement l'inconvénient d'augmenter les erreurs dues à la mesure de volumes restreints. Nous avons pris les précautions suivantes lors

du pipetage: 3 rinçages lors du prélèvement, 5 rinçages de la pipette dans l'eau physiologique stérile contenue dans l'entonnoir lors de l'homogénéisation. De cette manière les résultats obtenus sont concordants, comme le démontrent les résultats transcrits dans le tableau 17.

Tableau 17

Exp. No	4 filtrations sur M.F. et moyenne
I, 0,1 cc 1,0 cc	9-12-11-9 M. = 10 94-84-98-81 M. = 89
II 0,1 cc 1,0 cc	15-14-12-11 M. = 13 116-103-106-132 M. = 114
Suspension d'E. coli 20 994, incubation sur milieu d'Endo Difco 20 h. à 37.	

b) *Méthode par dilution*

C'est la méthode utilisée le plus couramment. Donnant de bons résultats dans le cas de numération sur plaques de Pétri, il semble naturel que les résultats soient également admissibles après filtrations sur membranes filtrantes, à condition d'employer pour chaque dilution au  $1/10$  une nouvelle pipette ( $0,5 \text{ cm}^3$  de la dilution précédente dans  $4,5 \text{ cm}^3$  d'eau physiologique stérile), pipette rincée 3 fois lors du prélèvement et 5 fois lors de la dilution.

On porte ensuite un volume donné (par exemple  $1 \text{ cm}^3$ ) des dilutions dont on suppose la concentration en germes favorable à une filtration sur membranes filtrantes, dans l'entonnoir de l'appareil à filtrer contenant de l'eau distillée stérile. On peut également porter un certain volume d'une dilution donnée dans de l'eau physiologique stérile (par exemple  $1,0 \text{ cm}^3$  dans  $500 \text{ cm}^3$  d'eau physiologique) puis agiter cette suspension et la maintenir à  $4^\circ$  pendant au moins 3 heures. Cette dernière méthode permet d'avoir à disposition un volume plus au moins considérable de suspension, d'où facilité de pratiquer un nombre important de filtrations s'il y a lieu.

Nous avons adopté cette dernière méthode (tableau 18).

Tableau 18

Exp. No	Dilution et volume filtré: moyenne de 4 filtrations sur milieu d'Endo Difco (20 h. à $37^\circ$ ) (suspension d'E. Coli 20,994)		
	$10^{-5}$ 1 cc x 10	$10^{-6}$ 10 cc	$10^{-7}$ 10 cc
I	1140	128	13
II	1210	127	12



## Conclusions

Pour l'analyse d'eaux très polluées, il y a intérêt à procéder par dilution successives au  $1/10$ . Pour des concentrations en germes inconnues, il est recommandable de filtrer un volume donné de 4 dilutions (par exemple  $10^{-1}$  à  $10^{-4}$ ) et de disposer les 4 M.F. sur le milieu nutritif adéquat réparti en boîte de Pétri de 14 cm de  $\phi$ . De cette manière, il sera possible d'utiliser une, deux ou même éventuellement trois membranes pour la numération des germes.

## Résumé

Dans ce travail concernant la technique de dénombrement au moyen des membranes filtrantes (M.F.), les auteurs ont tenté de déterminer les limites de précision de la méthode.

Ils ont ensuite comparé les résultats fournis par les M.F. à ceux donnés par les méthodes habituelles (étalement sur Pétri, dispersion en gélose préalablement fondue), utilisant ou non le procédé mathématique du nombre le plus probable (M.P.N.).

Ils ont précisé le nombre maximum des colonies dénombrables avec précision sur M.F. (240 pour *Escherichia coli*; 40 seulement pour *Klebsiella aerogenes*).

Ils ont étudié enfin la concordance des résultats obtenus soit par filtration de faibles volumes de matériel présumé très riche en germes, soit par dilutions successives de ce même matériel.

## Zusammenfassung

In dieser Arbeit betreffend die Technik der Auszählung mittels filtrierender Membranen (F.M.) haben die Autoren versucht, die Grenze der Genauigkeit der Methode zu bestimmen.

Sie haben dann die mit der F.M.-Methode erzielten Resultate mit denjenigen verglichen, die mit den üblichen Methoden erhalten wurden (Ausbereitung in Petrischalen, Dispersion in verflüssigtem Nähragar), mit oder ohne Anwendung des mathematischen Verfahrens der grösstmöglichen Zahl (M.P.N.).

Sie haben die höchste, mit Präzision zählbare Anzahl von Kolonien auf der filtrierenden Membran genau bestimmt (240 für *Escherichia coli*; nur 40 für *Klebsiella aerogenes*).

Sie haben endlich die Uebereinstimmung der Resultate studiert, die entweder durch Filtration geringer Volumen von vermutlich sehr keimreichem Material oder durch aufeinanderfolgende Verdünnungen desselben Materials erhalten werden.

## Summary

Mathematical discussion of the precision of the membrane filter technique for counting germs, compared with the other usual techniques. The minimum number of colonies which may be counted with precision by using the membrane filter technique is 240 for *Escherichia coli* and 40 for *Klebsiella aerogenes*.

### *Bibliographie (deuxième partie)*

- 1) *Novel E.*, Les techniques de numérations bactériennes (travail du Laboratoire de Bactériologie et Hygiène de l'Institut d'Hygiène), Genève 1941, p. 57 et suiv.
- 2) *Halvorson et Ziegler*, Application des méthodes statistiques aux problèmes bactériologiques. *J. of Bact.* **25** (1932).
- 3) *McCrary M. H.*, The numerical Interpretation of Fermentation Tubes Results. *J. Infections Diseases* **17**, 183 (1915).
- 4) *McCarthy J. A., Thomas H. A. et Delaney J. E.*, Evaluation of the reliability of coliform density tests. *Am. J. of Publ. Health* **48**, 1628-1635 (1958).
- 5) *Woodward R. L.*, How probable is the Most probable Number *J.A.W.W.A.* **49**, 1060-1068 (1957).
- 6) *Kabler P.*, Water Examination by M.F. and MPN procedures. *Am. J. of Publ. Health* **44**, 379-386 (1954).
- 7) *Broscheit A.*, Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis von *B. coli* in Wasser mit dem Titrations- und Membranfilterverfahren. *Zt. Bakt., I. Abt.* **160**, 96-97 (1954).
- 8) *Broscheit A. et Zimmermann E.*, Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis von *B. coli* in Wasser mit dem Titrations- und Membranfilterverfahren. *Arch. Hyg. Bakt.* **137**, 450-453 (1953).
- 9) *Adams R. B.*, Comparison of standard dilution and M.F. Methods. *J.A.W.W.A.* **49**, 1452-1458 (1957).
- 10) *Agnese G.*, Sull'uso di terreni con eptadecil solfato sodico e chloruro di trifetil tetrazolio per la colimetria delle acque su membrane filtranti. *Igiene* **50**, 609-619 (1957).
- 12) *Lang H.*, Vergleichende Trinkwasseruntersuchungen unter besonderer Berücksichtigung der sogenannten Warmblütercolibakterien mit dem Titrations- und Membranfilterverfahren. *Arch. Hyg. (Berlin)* **141**, 34-40 (1957).
- 13) *Conner R. M.*, Comparison of fermentation tube and Membrane filter techniques for estimation coliform densities in sea water. *Appl. Microbiol.* **5**, 141-144 (1957).
- 14) *Thomas H. A. et Woodward R. L.*, Estimation of coliforme Density by the Membrane filter and the Fermentation Tube Methode. *J. Am. Publ. Health* **45**, 1431-1437 (1955).
- 15) *Clark H. F. et Kabler P. W.*, The Membrane Filter in Water Quality tests. *Am. J. Publ. Health* **42**, 385-388 (1952).
- 16) *Novel E. et Burkard P.*, A propos de l'analyse colimétrique des eaux par la méthode des membranes filtrantes. *Ces Trav.* **50**, 188 (1959).