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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 59 (1968)

Heft: 1-2

Artikel: Les méthodes de numération des germes microbiens

Autor: Novel, Emile

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982166

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. 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. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

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. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

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. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 13.07.2025

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

Literatur

1. *Mohler H.:* Technische Hilfe der Vereinten Nationen, Dechema-Monographien 26 (1956) 403.
2. *Borgstrom G.:* Der hungrige Planet, BLV Bayrischer Landwirtschaftsverlag, München/Basel/Wien 1967.
3. *Mohler H.:* Ist die Welthungersnot unvermeidlich?, Haupt, Bern 1967.
4. *Paddock W.* und *P.:* Famine 1975!, Weidenfeld und Nicolson, London 1968.
5. *Adam R.:* Nordamerika, der Brotkorb der Welt, Ernährungs-Umschau 15 (1968) 111.
6. *Virtanen A. I.:* Ernährungsmöglichkeiten der Menschheit und der Chemie, Naturw. Rdsch. 14 (1961) 371.
7. *Calder N.:* Vor uns das Paradies?, Desch, München/Wien/Basel 1968.
8. *Meyer-Waarden:* Welchen Beitrag kann die Fischereiwirtschaft zur Linderung des Hungers in der Welt leisten?, Ernährungs-Umschau 14 (1967) 241.
9. *Fiechter A.:* Mikrobiologische Eiweißgewinnung aus Kohlenwasserstoffen, Chimia 21 (1967) 501.
10. *Champagnat A.* und Mitarbeiter: Biosynthesis of Protein-Vitamin-Concentrates from Petroleum, Nature 197 (1963) 13.
11. *Mohler H.:* Vom Hunger zum Mangel im Ueberfluß, Roche-Ztg. 1967, Heft 2, S. 3.

Les méthodes de numération des germes microbiens

Par *Emile Novel*

(Service d'hydrobiologie et de microbiologie des denrées alimentaires Genève)

Introduction

Dès le début de la science naissante qu'était alors la bactériologie — il y a moins d'un siècle — nombre de chercheurs se préoccupèrent de l'évaluation du nombre de germes que pouvait contenir un matériel donné par unité de volume. L'intérêt scientifique seul conduisait les expérimentateurs qui se contentaient de formuler un chiffre absolu mettant en évidence la présence de 6 millions de bactéries au ml dans une eau d'égout *(Miquel)* (1) ou l'extrême richesse en germes de la poussière qui comporte de 1 à 2 millions de microbes au gramme. L'on remua le sol à des profondeurs diverses pour en déterminer la teneur en micro-organismes où l'on en trouva plus que l'on ne pouvait l'imaginer (800 000 à 900 000 germes au gramme en moyenne). L'on fouilla les couches de l'atmosphère pour y déceler l'ermite microbien qui, à 3 000 mètres d'altitude, virevolte, unique, dans un espace vital d'un mètre cube; l'on traqua, microscope en main, le germe solitaire qui à chacune de nos expirations le libère des attaches préhensives des cils épithéliaux bronchiques échappant au sort malheureux de ses 599 confrères inspirés en même temps que lui. Il n'est pas jusqu'à la glace, la neige,

la grèle même qui n'aient été l'objet de dénombrements répétés. Bref, nul microbe, hormis les ultravirus — invisibles au microscope optique, mais non au microscope électronique — ne put se dérober aux regards scrutateurs de l'inquisition quantitative micrographique. Cette «libido numerandi» ne s'apaisa que pour reprendre un cours moins académique le jour où l'on s'aperçut que l'on pouvait tirer de l'analyse quantitative des arguments aussi décisifs que péremptoires susceptibles d'éclairer, par leur utilité directement pratique, de nombreux problèmes de portée médicale, prophylactique, hygiènique, sociale et économique.

L'eau, la première bénéficia de cet engouement «numératif» et l'on chercha le critère sérieux permettant de déclarer potable ou non une eau quelconque, qu'elle fût de source profonde, de nappe phréatique, de lac souterrain ou superficiel, de puits, de fleuve ou de rivière.

Ce sont les hygiénistes qui s'ingénièrent à trouver une base scientifique qui, en dehors de l' examen chimique habituel, puisse permettre de rejeter ou d'accepter une eau comme potable. Et ce critère fut, entre autres, le nombre de microorganismes bactériens présents au moment du prélèvement dans l'eau soumise aux investigations et à l'approbation des analystes.

Dès l'instant où l'on entrevit que nombre de maladies avaient pour véhicule de contage l'eau, les bactériologistes dénièrent toute importance à l'analyse chimique — ce qui est faux — pour glorifier la valeur absolue de l'analyse bactériologique qualitative aussi bien que quantitative. Il peut sembler, au premier abord, en effet, que quelle que soit sa charge en nitrates, en nitrites, en ammoniaque, en matières organiques, l'eau en examen ne saurait être suspectée si, par ailleurs, elle ne contient aucun germe pathogène tels le vibrion cholérique, le bacille typhique ou ses proches parents phylogénétiques comme les bacilles paratyphiques et autres Salmonella, les bacilles dysentériques (Shigella), Pasteurella tularensis (agent de la tularémie), les leptospires pathogènes, voire les virus de la poliomyélite, le virus de Coxsakie, et j'en passe.

Si, de façon certaine, l'eau qualifiée de pure n'est pas un milieu assurant, à proprement parler, une multiplication facile des germes microbiens — car nulle bactérie pathogène n'y trouve les conditions favorables à une reproduction massive — elle rend possible une vie latente, vie inhibée, amoindrie, durant laquelle l'élément microbien rassemble ses énergies de façon à «durer» coûte que coûte jusqu'au moment où, porté en un milieu nouveau, il trouvera les conditions eugénésiques qui lui permettront de faire souche avec abondance et rapidité. Peu de germes, en effet, même ceux que l'on nomme hydriques rencontreront dans l'eau pure les aliments nécessaires et indispensables à leur nutrition. Mais, dès que l'eau possède une richesse en matières organiques et en sels minéraux plus élevée que de coutume, et c'est là que l'analyse chimique trouve toute son utilité, elle joue le rôle d'un milieu, pauvre encore, mais d'une richesse suffisante pour permettre la végétabilité active d'un plus grand nombre de germes. Bien que le rapport teneur en matières organiques — nombres de microgermes ne soit pas conditionnellement proportionnel, il l'est le plus souvent et l'on peut affirmer qu'une eau suspecte à l'analyse chimique est presque toujours condamnée à l'examen bactériologique,

alors qu'on ne saurait assurer que la réciproque soit obligatoirement vraie: une eau pure, chimiquement, peut être déclarée non potable du point de vue bactériologique.

Il est entendu que pour la détermination de la potabilité d'une eau c'est l'analyse bactériologique qualitative qui est d'un intérêt prédominant. Mais l'analyse quantitative est loin d'être superflue. Indépendamment de sa valeur strictement scientifique, elle permet de mettre en évidence la pollution habituelle ou accidentelle, entre tel point et tel autre dans le parcours d'une canalisation; l'état de propreté ou de souillure d'un réservoir, l'eau destinée à être emmagasinée pénétrant avec une richesse de 80 germes au ml par exemple, et en sortant avec plus de 2 000 germes. Elle nous renseigne sur la qualité d'un filtre ordinaire ou sur les déficiences passagères ou définitives d'une masse filtrante (filtres à sable submergé ou non submergé, filtres à charbon, etc.). Elle rend possible le contrôle suivi d'une installation de javellisation ou de verdunisation et permet de juger de la solution hypochloritée utilisée, en fonction du brassage, du débit et du temps de contact; elle fournit de précieuses indications sur la rapidité de stérilisation d'une eau par un quelconque procédé chimique utilisant les dérivés chlorés, les permanganates, l'ozone, l'iode, les sels ferriques, etc. comme agents désinfectants. C'est également au moyen de l'analyse quantitative que l'on peut déterminer, entre autres, la valeur relative de divers bactéricides et établir la dilution minimale d'une solution antiseptique à utiliser vis-à-vis de telle ou telle espèce microbienne. Ces quelques exemples suffiraient déjà à nous montres l'intérêt directement pratique de l'analyse quantitative. Mais ce n'est pas tout!

En bactériologie technique, qu'il s'agisse de bactériologie laitière, ou de tout autre denrée alimentaire, agricole et industrielle, la détermination du nombre des germes dans un matériel quelconque, joue un rôle réellement prépondérant. Ce sont les changements bio-chimiques de ce matériel qui ont le plus d'importance. Mais ces changements sont sous la dépendance directe des enzymes présentes dont la production et l'activité est fonction du plus ou moins grand nombre des bactéries et des diverses espèces microbiennes qui les produisent. C'est surtout en industrie laitière que l'analyse bactériologique quantitative a pris toute sa valeur. Le lait, en effet, est un produit éminemment périssable et sa durée de conservation dépend uniquement de sa pouvreté en germes. Dès lors, on s'est ingénié à limiter au minimum les pollutions considérables auxquelles il est soumis durant la traite déjà, puis pendant le premier transport à la fruitière, lors du filtrage et de la réfrigération, bref pendant toutes les nombreuses manipulations par lesquelles il passe avant d'arriver au commerce de détail et enfin au consommateur. La teneur en micro-organismes peut donc étre utilisée comme critérium servant à qualifier le lait tout au long de sa «vie» itinérante.

Si le lait est théoriquement stérile en la mamelle productrice, il se contamine rapidement: le premier jet sortant du pis peut renfermer déjà de 500 à 1 200 bactéries au ml. Dès le contact avec le seau de traite, la contamination d'origine externe augmente rapidement. Il est avéré, en effet, que le nombre élevé de germes dans le lait dépend bien plus de son contact avec des récipients de traite

et de transport malpropres et avant tout d'un refroidissement défectueux que d'une traite négligée. *Prucha* (2) et ses collaborateurs ont montré que l'usage de bidons venant d'être nettoyés et encore humides pouvaient ensemencer le lait de 30 000 germes supplémentaires au ml et augmenter ainsi d'autant sa teneur en micro-organismes. Lors de la clarification l'augmentation du taux des bactéries du lait peut atteindre 100 % *(Inerney)* (3).

La contamination secondaire porte rapidement la teneur microbienne *(Guitonneau* et collaborateurs [4]) à plusieurs millions, voir dizaines de millions de micro-organismes et lorsque le lait caille il peut contenir jusqu'à 5 milliards de germes au ml.

Le nombre de germes a permis de classer les laits en laits de diverses qualités: le lait garanti ou certifié ne doit pas dépasser une richesse de 10 000 germes au ml, la qualité A ne peut renfermer que 200 000 bactéries au ml, la qualité B que 750 000 micro-organismes au ml, la qualité C qu'un million de microbes au ml (législation anglo-saxonne).

La teneur microbienne du lait est l'indication la plus précieuse *(Dorner)* (5) sur les soins plus ou moins méticuleux apportés à sa récolte et c'est le facteur le plus important de classement permettant le payement d'un lait selon sa qualité. L'on a créé des concours de lait propre portant uniquement sur la numération microbienne effectuée sur les laits recueillis au pis et au seau *(Leroy)* (6). Les notes de 0 à 10 furent attribuées aux concurrents d'après le nombre de germes décelé au ml.

L'on a étudié encore le lait complet, le lait écremé, la crème provenant de ce lait à l'origine complet. L'on a mis en évidence le nombre de bactéries qui se trouve dans les laits condensés, sucrés ou non, dans les laits desséchés, dans les laits en poudre. L'on a pu suivre, phase après phase, l'augmentation ou la diminution du nombre des microbes tout au long des divers temps de fabrication de ces différentes catégories de lait en boîte. Il a été possible de pouver *(Macy)* (7) que le nombre de bactéries atteignait au moment même du conditionnement de 500 à 50 000 germes par g dans le lait en poudre; qu'une réduction massive de ce nombre s'opérait durant la première année de conservation et qu'au bout de 5 ans le 99 % des microbes avait disparu.

C'est grâce à l'analyse quantitative que l'on a pu se rendre compte de l'efficacité indéniable de la pasteurisation ou de l'upérisation. Il est indiscutable que seuls les procédés bactériologiques conviennent pour étudier et contrôler le fonctionnement de l'ensemble d'une installation de pasteurisation. L'examen bactériologique des laits avant et après pasteurisation a permis de constater que cette technique fait tomber le nombre des germes de 4—5 millions à 8 000 au ml environ.

Mais il a mis également en évidence ce fait surprenant: si la pasteurisation est, en général et d'une façon habituelle, un moyen efficace de destruction des micro-organismes du lait, il est certains cas particuliers où, paradoxalement, la teneur bactérienne du lait est plus élevée *après* qu' avant le chauffage *(Ward)* (8). Cela tient simplement au fait que des bactéries thermophiles, facultatives ou strictes, dont le développement est favorisé entre 37,8 ° et 62 °, se multiplient sur les

parois des stérilisateurs et ensemencent le lait lors de la pasteurisation elle-même. Le dénombrement des germes enfin sert de critère permettant d'apprécier comparativement la valeur de tel ou tel procédé ou de tel ou tel appareil de pasteurisation (ou d'upérisation).

La teneur en germes de la crème glacée (ice-cream) a été étudiée par de nombreux auteurs américains, notamment par *Fabian, Olson* et *Fay* (9): elle oscille entre 10 000 et 80 000 000 de bactéries au ml avec une moyenne de 1 million; le nombre des germes est d'autant plus bas que les laits ayant fourni la crème sont moins riches en microbes.

Le beurre a également été l'objet de recherches quantitatives (plusieurs centaines de mille germes au g) et l'on a été bien étonné de savoir que chaque gramme de fromage pouvait être peuplé de 10 à 30 millions de bactéries.

Signalons enfin que, dans un autre ordre d'idées, la numération microbienne a été appliquée non seulement pour déterminer la valeur bactéricide du sang, mais comme critère permettant de prévoir — par le plus ou moins grand pouvoir bactéricide de son sang — la résistance d'un organisme vis-à-vis d'une infection. Les résultats cliniques obtenus, selon *Fajermann* et *Damme* (10), démontrent d'une façon péremptoire que l'épreuve de la bactéricidie possède une réelle valeur pronostique.

Comme il est facile de s'en rendre compte par les nombreuses et diverses possibilités d'utilisation citées, et nous aurions pu signaler encore bien d'autres exemples, le dénombrement des germes microbiens possède une portée pratique considérable, et cela dans des domaines très différents, dont on ne se doute guère dans le grand public aussi bien que dans les milieux cultivés, voire scientifiques.

Or, que valent les chiffres trouvés? Sont-ce des valeurs absolues? Des nombres approchés? Lorsque, rapport d'analyse en mains, vous apprenez que l'eau que vous venez de soumettre à l'examen contient 10 788 germes ou que le lait que vous buvez renferme 3 758 250 bactéries au ml, vous n'êtes pas loin de croire que les produits analysés possèdent effectivement les micro-organismes signalés — *pas un de plus, pas un de moins* — par la bulletin de réponse du laboratoire. Il n'en est rien. Une telle précision est impossible à atteindre. C'est ce que nous alons tenter de démontrer dans notre présent travail, en nous efforçant de donner aux résultats obtenus une valeur non pas absolue, mais qui serre de près la réalité, compte tenu des fluctuations probables dues aux nombreuses causes d'erreurs dont les difficultés techniques des multiples méthodes de l'analyse bactériologique quantitative sont seules responsables.

Les méthodes de numération des germes microbiens

Les méthodes de numération en vue du dénombrement des germes microbiens contenus dans un matériel quelconque peuvent être groupées en 3 catégories, soit:

I Méthodes utilisant l'examen microscopique direct.

II Méthodes utilisant les cultures en milieux liquides.
III Méthodes utilisant les cultures en milieux solides.

Ces 3 groupes répondent, dans leur ordre, et à peu de choses près chronologiquement, à la découverte de ces méthodes et à leur utilisation dans les analyses bactériologiques.

Aujourd'hui encore ces diverses possibilités d'expertises micrographiques subsistent côte à côte. Chacune d'entre elles, il faut le dire d'emblée, présente des avantages sérieux et des inconvénients réels. Elles ne donnent pas — tant s'en faut — des résultats exactement superposables et leur choix est conditionné par les renseignements particuliers que l'on désire obtenir de l'une ou l'autre de ces techniques. Si ce sont les microbes vivants seuls dont on désire connaître le nombre, il faut s'adresser à une méthode utilisant les cultures comme moyen d'investigation. Si peu nous chaut que les éléments microbiens soient vivants ou morts, l'on peut utiliser sans autre un procédé microscopique direct qui nous permettra de savoir quel est le nombre total des micro-organismes dans une suspension donnée.

Nous allons donc examiner quelques-unes des différentes techniques proposées et nous envisagerons, plus loin, avec le sens critique qui s'impose la valeur respective de ces diverses méthodes en fonction des nombreuses applications pratiques auxquelles elles peuvent prétendre.

Les procédés de numération employant l'examen microscopique direct

Rien n'est plus simple, semble-t-il, que de procéder à la numération des germes d'une suspension microbienne quelconque. En réalité, si l'on veut tenir compte des nombreuses causes d'erreurs possibles, ce procédé, comme les autres d'ailleurs, est d'exécution relativement difficile.

En principe, il suffit de déposer sur une surfaca connue ou à l'intéreur d'une chambre creusée, de volume exactement déterminé, en une lame porte-objet, une quantité donnée de la suspension à analyser. Puis à l'aide du microscope (objectif fort à sec ou objectif à immersion) de compter les micro-organismes se trouvant dans un certain nombre de champs microscopiques. La relation entre le nombre de champs totaux et les champs microscopiques examinés, soit par conséquent entre la surface totale (ou volume) de la chambre et la surface (ou volume) des champs explorés, permettra mathématiquement parlant, de déterminer aussi exactement que possible, connaissant le nombre moyen de bactéries par champ, le nombre de germes présents dans l'unité de volume choisie du matériel analysé.

L'examen microscopique direct comporte plusieurs modalités techniques, à savoir:

a) l'examen à l'état frais entre lame et lamelle;
b) l'examen après dessiccation et coloration;
c) l'examen à l'ultramicroscope.

a) *l'examen à l'état frais*

L'examen à l'état frais entre lame et lamelle est un procédé des plus simples et probablement le plus ancien. Il suffit, en effet, de placer sans préparation aucune une goutte de l'émulsion microbienne à dénombrer sur un porte-objet et après l'avoir recouverte d'un couvre-objet, de pratiquer l'examen microscopique immédiat.

Bien des micrographes se sont occupés entre 1850 et 1880 de l'appréciation du nombre des germes dans un liquide quelconque sans toutefois préciser par des chiffres la richesse des suspensions. Ils se contentaient, (*Cohn* [11], *Hirt* [12]) entre autres, d'une affirmation subjective, en mentionnant que les liquides examinés étaient extrémement ou moyennement riche ou, au contraire, pauvre en bactéries.

Il faut arriver en 1896 où l'école allemande représentée plus spécialement par *Eberle* (13), *Hueppe* (14) (1898) *Winterberg* (15) (1898) et *Liebreich* (16) (1910) utilisa des cellules calibrées, analogues à celles employées pour dénombrer les éléments figurés du sang, dans lesquelles ces expérimentateurs plaçaient les suspensions microbiennes. En tenant compte du nombre des champs microscopiques examinés et du volume total des chambres inspectées, ces auteurs arrivèrent à une numération plus facile et dont la valeur — exprimée en chiffres cette fois — était bien supérieure aux précédents procédés.

Henriques (17) (1923) pour éviter de compter 2 ou 3 fois les mêmes bactéries mobiles se déplaçant plus ou moins rapidement d'un champ à l'autre ou simplement pour diminuer l'intensité, toujours marquée, du mouvement brownien des particules dans un milieu liquide fluide, stabilise le produit à examiner au moyen d'un colloïde protecteur. Il préconise, pour cela, l'adjonction de 0,5 à 2 % de peptone à la suspension bactérienne.

D'autres micrographes utilisent, dans le même but, soit la gélatine, soit l'agar-agar, soit encore un complexe gélose-gélatine à diverses concentrations.

Méthode de Bonifas et Novel (18) (1952)

Les auteurs ont essayé de modifier les cellules hématimètres du commerce et grâce aux bons soins d'une fabrique d'instruments de précision de la place, ils ont pu disposer de trois hématimètres modifiés à deux cellules qui sont profonds respectivement de 11, 16 et 18 mμ. Il est très difficile de prévoir la profondeur qu'aura la cellule après le rodage, mais il est facile de la mesurer avec une extrême exactitude, au niveau de chaque réseau. Ces derniers posséderont donc un coefficient propre par lequel on multipliera le nombre moyen de bactéries comptées dans un carré élémentaire (1/400 mm^2), pour trouver le nombre de bactéries par centimètre cube. Ce coefficient, pour une profondeur de 16 mμ par exemple, est de $2{,}5 \times 10^7$.

La numération, pour être utile, ne doit exiger que cinq minutes environ. Il est nécessaire pour cela d'utiliser *un microscope comportant un dispositif d'éclairage à contraste de phase,* avec un objectif à sec grossissant quarante fois, et un oculaire, dix fois. Ces rapports permettent d'observer la profondeur presque totale de la couche liquide avec la même mise au point de l'objectif.

La valeur des nombres obtenus est exacte pour autant que l'on compte les bactéries contenues dans trois réseaux de 16 carrés élémentaires, et que le nombre moyen de bactéries par carré ne soit pas inférieur à 3. Si ce nombre est plus petit il faudra dénombrer les bactèries dans 100 carrés, ou, mieux encore, dans tout le réseau. Le nombre maximum de bactéries que l'on peut compter dans un carré ne dépasse guère 30, et encore ce nombre ne peut-il être atteint que par un observateur exercé. Les concentrations qui permettent donc la numération directe sont comprises entre 2,5 et 75×10^7 bactéries par ml. Il faut recourir à la dilution préalable pour faire le dénombrement d'une suspension plus concentrée.

La numération directe est applicable à de nombreuses mensurations. *Elle a l'avantage de permettre l'estimation du nombre de bactéries contenues dans des amas ou des chaînettes,* si ces derniers ne sont pas trop gros. Elle est presque indispensable pour établir des courbes de survie ou de croissance. Les auteurs pensent que n'importe quelle fabrique d'instruments de précision qui travaille des surfaces de verre optiquement planes est capable de diminuer l'épaisseur des bandes d'appui d'une cellule hématimètre et de mesurer la différence de niveau entre ces dernières et le plan du réseau.

b) *l'examen après dessiccation et coloration*

Le principe de cette méthode consiste à étaler sur une surface donnée, une quantité connue de la suspension microbienne à examiner; puis après dessiccation et fixation à la flamme, ou à l'acide osmique, ou par tout autre procédé chimique de fixation, le frottis est coloré au moyen d'un des colorants habituellement utilisés en bactériologie courante. Il suffit ensuite d'établir la relation entre le nombre de champs-microscopiques examinés et le nombre de champs contenus dans la surface d'étalement pour déterminer, connaissant la quantité du matériel prélevé pour faire le frottis, le nombre de germes présents dans l'unité de volume choisie (mm^3 ou ml^3).

C'est *Koch* (19) qui, en 1882, introduisit la méthode dans l'examen des eaux. La goutte d'eau est évaporée rapidement au dessus d'une flamme et les microbes desséchés sont colorés soit au bleu de méthylène, soit à la fuchsine diluée, soit par la méthode de Gram avec coloration de fond. Le frottis est examiné à l'immersion.

D'autres micrographes, parmi lesquels *Klein* (20), *von Hebewerth* (21) procédent différemment. Ils mélangent un volume connu de la suspension microbienne à une solution colorante dont ils prennent une quantité exactement déterminée. Ils étalent une goutte du mélange, de volume connu également, sur une lame porte-objet portant en son centre un carré limité par des traits au diamant, distants de 1 cm, en ayant soin d'effectuer le frottis exactement entre ces limites et sur toute la surface du cm^2. Déterminant le rapport entre le nombre moyen de bactéries trouvées dans un champ microscopique — après avoir compté 20, 30 ou 40 champs — et le nombre de champs microscopiques contenus dans un cm^2, puis prenant en considération la proportion du mélange suspension microbienne — solution colorante, les auteurs arrivent à estimer facilement le nombre de germes dans un ml.

La technique de Wright (22)

La technique de *Wright* établie en 1906, en vue de la détermination du nombre des germes contenus dans les préparations vaccinales, consiste à mélanger 1 ml de la culture à analyser à un égal volume de sang humain, mélange auquel on adjoint 3 ml d'eau physiologique colorée au bleu de méthylène. Après avoir prélevé une goutte de cette suspension qu'on étale sur une lame porte-objet, on laisse sécher la préparation, puis on l'examine. On compte alors, dans un même champ microscopique, les hématies seules d'une part, et, d'autre part, les éléments bactériens. Connaissant le nombre des hématies, il ne reste plus ensuite qu'à établir le relation existant entre les unes et les autres pour en déduire le nombre de germes dans la suspension initiale.

Variantes de la technique de Wright

Pozzi-Escot (23) utilise, en vue du dénombrement des microbes du lait, le principe même de la technique de *Wright*. Etant donné que les bactéries du lait sont habituellement bien moins nombreuses, par unité de volume, que dans les suspensions servant à préparer les vaccins, l'auteur préconise l'emploi du sang dilué.

Dreyer propose d'utiliser des cellules nucléées — dont il ne précise d'ailleurs pas la nature — fixées par une solution de sublimé, lavées ensuite trois fois à l'eau physiologique. Il prépare de plus, après addition d'une petite quantité de formol, une suspension standard contenant 30 000 cellules par mm^3. Lors de la préparation du matériel à examiner, un volume connu de la suspension standard est mélangé à une quantité fixe de ce matériel, Puis on ajoute un nombre de gouttes déterminé de bleu de méthylène à 5 %. A l'inspection microscopique les cellules nucléées sont comptées d'une part et, d'autre part, les micro-organismes bactériens. De cette façon l'on détermine le *nombre relatif* de ces derniers par rapport au nombre de cellules de l'émulsion standard; tenant compte ensuite du «titre» de la suspension, il est facile de calculer le nombre absolu des microbes contenus dans le matériel original.

Koroleff a choisi une levure, le Schizosaccharomyces pombe, pour constituer la suspension standard. *Fries* utilise également une suspension de levures renfermant un nombre connu de cellules qui'il ajoute à un volume déterminé du produit à analyser.

La méthode de Breed (24)

Le principe de la méthode de *Breed* est le suivant: 1 centième de ml du matériel à analyser quantitativement est porté, à l'aide d'une pipette capillaire très exactement calibrée, sur une lame porte-objet qui comporte en son centre un carré d'un cm de côté. Après étalement sur la totalité du cm^2, la préparation est desséchée, fixée, puis colorée. Le lavage à l'eau, pour enlever l'excès de colorant, opéré, le frottis est séché à nouveau. L'on examine ensuite, à l'immersion, 20 à 30 champs microscopiques et l'on détermine quel est, en moyenne, le nombre de micro-organismes par champ. Connaissant la surface du champ microscopique, l'on

calcule le nombre de germes présents sur la totalité de l'étalement et, de là, on peut déduire le nombre de germes contenus au ml.

Demeter (25) a apporté à la technique de Breed une simplification importante en usant, lors de l'étalement, d'un chablon qui est placé directement sur la lame porte-objet et à l'intérieur duquel l'on étend le matériel à inspecter. Ce chablon comporte 4 carrés d'un cm de côte, ce qui permet d'effectuer simultanément 4 dénombrements de suspensions microbiennes différentes sur la même lame.

La méthode de Skar (26)

La méthode de *Skar* (26), utilisée surtout — comme la méthode de *Breed* — pour le dénombrement des microbes du lait, consiste à compter les germes visibles d'une quantité donnée du matériel à analyser, dans un champ microscopique de surface connue. La lame porte-objet présente une surface rectangulaire de 500 mm^2 dont les côtés sont tracés en relief. L'oculaire comporte, gravé sur la lentille interne inférieure, deux carrés et un cercle à centre commun et à surface connue, divisés en quatre par 2 axes perpendiculaires. L'on règle tout d'abord la longueur du tube du microscope, de telle façon que le côté du grand carré ait 50 microns; la surface sera donc de

$$50\ m\mu \times 50\ m\mu = 0{,}0025\ mm^2, \text{ soit } 1/400 \text{ de } mm^2.$$

La surface de petit carré, 10 fois plus petite, atteindra 1/4000 de mm^2, la surface du cercle, 10 fois plus grande, sera de 1/40 de mm^2.

On prend 5 cc de matériel auxquels on ajoute 0,20 ml de bleu (bleu de méthylène, bleu Borel). Après avoir agité l'on prélève, à la pipette capillaire, 20 mm^3 du produit à analyser qui sont portés sur la lame préalablement nettoyée à l'alcool. L'étalement est effectué aussi régulièrement que possible en inclinant la préparation en tous sens; puis on la laisse sécher à l'abri des poussières atmosphériques.

Estimons à présent le volume du matériel visible dans un des carrés ou dans le cercle de l'oculaire. Nous savons que la surface du grand carré est égale à 1/400 de mm^2, celle du rectangle gravé sur la lame porte-objet est de 500 mm^2. Au travers du grand carré de l'oculaire nous verrons donc une certaine quantité de la surface totale du rectangle de la lame. Cette surface est égale à $\frac{1/400}{500}$ soit au total au 1/200 000 du rectangle. Or, sur ce rectangle l'on a étalé 20 mm^3 ou 1/50 de matériel. Il y en aura 200 000 fois moins dans la surface perçue à travers le grand carré de l'oculaire soit

$$\frac{1/50}{200\,000} \quad \text{soit} \quad \frac{1}{10\,000\,000} \quad \text{de ml.}$$

Si, par exemple, l'on trouve un germe en moyenne dans chacun des grands carrés, après avoir examiné minutieusement 30 à 40 champs microscopiques, il y aura exactement 10 000 000 de germes par ml du matériel analysé. Il y en aurait par conséquent 100 000 000 si nous mettions en évidence une bactérie, en moyenne, dans le petit carré, celui-ci étant d'une surface 10 fois plus petite, et le résultat

serait de 1 000 000 d'éléments microbiens, si nous décelions un seul micro-organisme dans le cercle, ce dernier étant d'une surface 10 fois plus grande. Il convient toutefois de signaler que l'adjonction de 0,2 ml de solution colorante pour 5 ml de matériel détermine une augmentation du volume total de 1/25, augmentation dont il faut tenir compte lors de l'appréciation finale du nombre des microbes.

Procédé de Pien et Baisse (27)

Pien et *Baisse* ont mis au point une méthode — pour dénombrer les germes du lait — basée sur le même principe: ils étalent un volume connu de matériel sur une surface connue.

Au moyen d'une pipette de précision, ils portent 1/100 de ml de lait au centre d'un carré d'un cm de côté, gravé au diamant sur une lame porte-objet. Après étalement et dessiccation, lavage à l'alcool, dégraissage au xylol, puis rinçage à l'éther, ils colorent le frottis au bleu de méthylène en solution aqueuse à 2 pour 1 000, laissant agir le colorant durant 20 à 30 secondes.

Les auteurs utilisent, pour l'inspection de la préparation, une combinaison oculaire-objectif donnant pour diamètre du champ microscopique 120 mμ. En parcourant le côté du carré d'un trait de diamant à l'autre, on explore la totalité d'une bande ayant la longueur du carré (1 cm) et la largeur du champ (120 mμ) soit $1 \times 0{,}012 = 0{,}012$ cm². Etant donné que sur la surface de 1 cm² l'on avait procédé à l'étalement de 1/100 de ml, la bande explorée dans la totalité représente un volume de 0,0012 ml. Comme, d'autre part, le lait avait été dilué initialement par $CaCl_2$ pour obtenir une dessiccation parfaitement homogène, le nombre de germes décelé dans cette bande correspondra aux micro-organismes de 1/10 000 de cc. Autrement dit pour $\times$ bactéries comptées dans une bande, le nombre total des germes sera 10 000 fois plus grand.

Pien et *Baisse* préconisent le dénombrement des microbes rencontrés dans deux bandes perpendiculaires: il suffit, dans ce cas, de multiplier par 5 000 le nombre total des germes comptés, pour avoir une très bonne appréciation quantitative des micro-organismes par unité de volume.

Méthode de Knaysi et Ford (28)

Ces auteurs ont tenté de mettre en évidence — par *un méthode de numération directe — et les microbes vivants et les microbes morts dans le lait.*

Un ml de lait à examiner est additionné de 0,5 ml d'un colorant composé de 0,1 % de bleu de méthylène et de 0,1 % de bleu de Nil et 0,5 ml d'un mélange de 8 % de gélatine et de 2 % d'agar. On porte 0,1 ml du mélange sur la lame et l'on couvre d'une lamelle couvre-objet de 12,8×12,8 mm. On compte les cellules ayant absorbé le colorant: ces cellules représentent les microbes morts.

A un même mélange, on ajoute une goutte de NaOH à 0,7 N. Dans ce mélange tous les micro-organismes présents sont tués. L'écart entre les chiffres de la première préparation et les chiffres de la seconde représente le nombre de micro-organismes vivants dans le lait.

On détermine le nombre de bactéries dans un ml de lait en se basant sur la quantité de lait (0,1 ml) étalée sur la préparation, la surface du couvre-objet et le nombre de champs microscopiques examinés.

Méthode de Anne Marie Ronchese (29)

Ce procédé, signalé en 1940 par l'auteur, comprend, dans un étalement régulier sur lame, des volumes égaux d'une suspension microbienne et d'une solution chimique à microdosage facile. Après coloration, l'on compte le nombre de germes dans l'étalement dont la surface est connue. On dissout ensuite la substance chimique étalée avec les microbes. Le résultat du microdosage fournit le volume de la suspension étalée et, de là, celui de l'émulsion microbienne ayant participé à l'étalement. Connaissant le nombre de germes contenu dans ce volume l'on détermine le nombre de germes dans un cm^3.

Technique

Le témoin chimique est constitué par une solution colloïdale de chlorure d'argent (1,25 g de nitrate d'argent dissous dans 50 ml de gomme arabique à 5 %) sur laquelle on verse, par petites portions et en agitant, une solution chlorurée (0,45 g de NaCl dissous dans 50 ml d'eau distillée).

Le sol gélose-gélatine utilisé en vue de l'étalement régulier comporte la formule suivante: eau dist. 1 000 ml, gélose 12,5 g, gélatine 30 g, formol 10 ml.

La suspension microbienne doit être diluée de façon à ce que son opacité soit voisine de 40 ⌀ Vernes.

La coloration s'effectue au moyen d'une solution alcoolique de violet de méthyle.

De plus, ce procédé demande l'emploi d'une solution cyanurée: cyanure de potassium N/10,5 ml, ammoniaque 10 ml, eau dist. 100 ml et d'une sol. iodurée de K 0,1 g dans 100 ml d'eau distillée.

Etalement

A 2 ml de gélose-gélatine ajouter exactement 1 ml de la suspension microbienne, puis, après mélange, 1 ml exactement de l'émulsion colloïdale de chlorure d'argent et II gouttes de formol. On étale, à l'aide d'une pipette Pasteur 0,3 ml du mélange sur la surface de la lame qui est ensuite placée tout à fait horizontalement, sur une plaque d'ébonite portée elle-même sur bain de mercure. Le mélange s'étale alors régulièrement en couche mince. La solidification du sol intervenue, la lame est mise à l'étuve à 37 ° pour obtenir une dessiccation rapide.

La coloration est réalisée en laissant agir durant 50 secondes le violet et, après lavage à l'alcool à 45—50 °, la préparation est séchée à nouveau.

L'on détache ensuite le sol gélose-gélatine de la surface de la lame sauf en son centre où l'on a délimité précédemment un carré de 23 mm de côté. On épuise alors ce carré, et, à 3 reprises, au moyen de 3 ml de solution ammoniacale à 10 %. Il suffit ensuite de pratiquer un dosage précis — à la chambre noir — de la solu-

tion ammoniacale argentique récupérée, en versant, après adjonction d'une goutte de solution iodurée au 1/1 000, la solution cyanurée par gouttes espacées. Le louche initial diminue d'intensité et lorsqu'il a disparu entièrement, ajouter encore IX gouttes de solution iodurée. Une opalescence nouvelle se produit. On la fait disparaître par additions minimes de solution cyanurée. Il faut noter alors la quantité totale de cyanure versé et, par addition nouvelle de X gouttes de solution, on s'assure du virage définitif.

Soit donc V le nombre de cyanure versé et correspondant au chlorure d'argent étalé sur la surface S de la lame. On détermine ensuite dans les mêmes conditions la quantité de cyanure correspondant à 1/100 de ml suspension colloïdale de chlorure d'argent et, par conséquent, correspondant également à 1/100 de la suspension microbienne à analyser quantitativement. Pour cette détermination l'on étend exactement à 100 ml un ml de la solution argentique à laquelle on ajoute encore 8 ml de solution ammoniacale à 10 %. L'on opère sur 1 ml de la solution.

Nous obtenons alors la relation suivante:

$$\frac{V \times 0{,}01}{V'} = V''$$

ou V′ = le nombre de gouttes de cyanure versées et V″ le volume en ml de la suspension microbienne étalée sur la surface S.

La numération des germes bactériens est conduite, comme d'ordinaire, en examinant un certain nombre de champs microscopiques afin de déterminer le nombre moyen de microbes par champ.

Etant donné que l'on connait:

1. le nombre moyen de germes par champ (N)
2. la surface du champ microscopique (s)
3. la surface de l'étalement (S)
4. le volume de la suspension microbienne étalé sur la surface S (VM)

le nombre de germes dans 1 ml de suspension microbienne est donné par la formule suivante:

$$\frac{N \times S/s}{V''}$$

Il faut tenir compte, s'il y a lieu, du taux de dilution.

c) *Examen direct à l'ultramicroscope*

Nous mentionnons cette méthode de numération bactérienne pour mémoire, afin d'être, autant que possible, complet — bien qu'elle ne soit pas entrée dans la pratique courante.

Son protagoniste *Ammann* (30) introduit le matériel à examiner dans une chambre à numération d'un des modèles utilisés pour le dénombrement des éléments figurés du sang. L'opération est conduite avec un oculaire à fort grossis-

sement (12 ou 18) et avec un objectif à immersion sous éclairage puissant. La détermination du nombre total des germes se fait exactement comme dans les autres procédés de numération directe. L'auteur affirme que la méthode est très expéditive et ne demande guère qu'une heure de microscopie.

II. Méthodes utilisant les cultures en milieux liquides

Ces méthodes, les plus anciennes, ont été mises en évidence dès les premiers temps de la science bactériologique par *Miquel, Fol* et *Dunant, Chauveau* et *Arloing*, en particulier. Elles ne sont plus guère employées aujourd'hui. En Amérique pourtant on leur a gardé une place d'honneur, et bien qu'en Europe on ne les utilise qu'exceptionnellement, elles peuvent encore rendre des services appréciables.

Méthode de Miquel (1)

Miquel a préconisé, dès 1870, une méthode d'analyse bactériologique quantitative usant de milieux nutritifs liquides, procédé auquel il a donné le nom de «Méthode de fractionnement». Cette méthode repose sur le fait que la totalité des micro-organismes renfermés dans un volume déterminé de matériel à analyser, 1 ml par exemple, peut être répartie dans une quantité plus ou moins grande d'un liquide stérilisé (eau dist., eau physiologique, bouillon . . .) de telle façon que chaque goutte de ce mélange (goutte de 1/20 ou 1/25 de ml) ne renferme qu'un ou zéro germe microbien. Ainsi une certaine proportion des gouttes ensemencées en milieux appropriés ne donnent pas de culture et sont, par conséquent, dépourvues de tout microbe, donc stériles. La relation entre le nombre des cultures ayant montré un développement et celles qui sont restées stériles, permet l'appréciation, en tenant compte de la dilution initiale, du nombre de germes contenus dans le matériel soumis à l'examen.

Le matériel nécessaire pour pratiquer une analyse dans ces conditions consiste en pipettes jaugées ou calibrées, très exactement, en ballons d'eau stérilisée pour effectuer les dilutions et en petits flacons renfermant le bouillon (ou autre milieu liquide) à ensemencer.

Technique de dilution et d'ensemencement

Le matériel à analyser est, tout d'abord, dilué au titre voulu. Il est ensuite distribué dans 36 flacons du milieu liquide choisi, à savoir: 1 goutte dans 18 flacons et 2 gouttes dans chacun des 18 autres cultures.

Une expérience parallèle est conduite en même temps avec le matériel à analyser dilué à un titre deux fois plus élevé. Les 72 cultures sont placées à l'étuve, à la température de 30 à 35 °, durant 15 jours au minimum. Après cette période d'incubation, on procède à la numération des bactéries, c'est à dire, dans le cas particulier, à la «lecture» des ballons dans lesquels se remarque un développement et de ceux qui sont restés stériles. La proportion entre les cultures

«positives» et «négatives» et le nombre total des cultures ensemencées donne le résultat du nombre des germes végétant dans le produit original. On prend ensuite la moyenne des résultats fournis par la première et la seconde expérience.

Supposons, par exemple, que 18 flacons aient été ensemencés au moyen d'une goutte d'eau d'une suspension microbienne diluée au 1/10 000, et que les 18 autres flacons de la série de 36 cultures aient reçu 2 gouttes de la même suspension. Nous avons utilisé au total 54 gouttes. Après 15 jours d'incubation à 30 °, nous voyons que 6 flacons montrent un trouble, les 30 autres étant restés stériles. Nous pouvons donc affirmer que 6 germes vivants existaient dans les 4 gouttes ensemencées; autrement dit, 54 gouttes diluées au 1/10 000 renferment 6 bactéries. Or, les pipettes employées débitent XXV gouttes au ml. Nous pouvons donc établir la relation suivante:

$\frac{54}{25} = 2{,}12$ ml de suspension microbienne, d'où $\frac{2{,}12}{10\,000} = 6$ bactéries. Si nous voulons connaître le nombre de bactéries au ml, nous n'avons plus qu'à faire le calcul suivant:

$$\frac{1}{10\,000} = \frac{6}{2{,}12} = 2{,}83 \times 10\,000 = 28\,300 \text{ bactéries au ml.}$$

Méthode de Chauveau et Arloing (31)

La méthode des auteurs lyonnais est semblable, en son principe fondamental, à celle de *Miquel.* Ils admettent également que chacune des gouttes ne contient qu'un seul germe et ils répartissent un certain nombre de gouttes dans de nombreux ballons de bouillon. Ils utilisent des pipettes extrêmement fines comportant un débit de 150 gouttes au ml. Ils ensemencent 1 cm^3, soit donc 150 gouttes, dans 150 cultures: de cette façon, le résultat après les 15 jours usuels d'incubation est «lisible» immédiatement. En effet, 25 cultures fertilisées permettent de conclure de suite à la présence de 25 germes dans 1 ml de matériel.

Méthode de Fol et Dunant (32)

Les expérimentateurs genevois ont également appliqué le principe fondamental de *Miquel,* à savoir la dilution du matériel initial directement dans le bouillon nutritif, réparti ensuite dans des ballons au moyen d'une pipette spéciale ajustée à une burette de 100 ml de contenance. Après une mise en incubation de 4 semaines, les cultures ayant cultivé sont dénombrées et l'estimation du nombre de germes au ml s'effectue de la même manière que dans le procédé de *Miquel.*

Méthode américaine

La méthode américaine repose toujours sur le même principe, à savoir la dilution préalable du matériel à ensemencer et sa distribution dans des tubes de milieux nutritifs liquides. *Halvorson* et *Ziegler* (33) ont établi un grand nombre

de formules, basées généralement sur les logarithmes naturels, et des tables de probabilité qui permettent un calcul rapide du contenu microbien d'une suspension quelconque.

Les *«Standard methods»* (34) proposent toujours, dans leur dernière édition de *1961*, cette technique (most probable number ou MPN) pour la mise en évidence et le dénombrement des coliformes.

III. Méthode utilisant la culture sur milieux solides

Toutes les méthodes utilisant la culture sur milieux solides en vue de la numération des germes reposent sur le même principe fondamental qui comporte, à sa base, l'introduction d'un volume connu de matériel à analyser en des boîtes de *Petri* ou de *Lafar*, de *Lindmann*, de *Schumberg* ou autres, dans la plaque inférieure de laquelle on verse ensuite le milieu préalablement liquéfié. Après refroidissement, chaque germe est emprisonné de toute part par le substratum devenu solide et commence, placé à température convenable, à se multiplier jusqu'à devenir un conglomérat visibile à l'oeil nu, soit à la loupe, soit encore au microscope, après un certain nombre de jours d'incubation. L'on admet donc, implicitement, que c'est bien un seul élément microbien — et non deux ou trois — qui donne naissance à une colonie visible. Il ne reste plus qu'à totaliser les colonies décelées dans toute la masse du milieu des plaques pour obtenir l'évaluation, les calculs nécessaires avant été faits, du nombre des germes se trouvant dans l'unité de volume.

Ces procédés de numération sont conditionnés par certains facteurs relevant:

a) du milieu de culture utilisé
b) du pH de la culture
c) de la température d'incubation
d) de la durée du séjour à l'étuve.

Il est donc indispensable pour que les dénombrements soient concordants et comparables que tous ces facteurs, d'une expérience à l'autre, soient identiques. Or, il est pour ainsi dire impossible techniquement parlant, de réaliser lors de la fabrication des milieux, des conditions exactement superposables: les peptones utilisées, bien que de la même marque (*Witte, Chapoteaut,* etc.), peuvent avoir des qualités légèrement différentes, le pH, malgré un ajustage minutieux, peut varier d'une quantité infinitésimale, le temps de chauffe et de stérilisation peut être de quelques secondes à une minute trop long ou trop court, le température à l'autoclave peut dépasser de quelques degrés, en plus ou en moins, la limite fixe choisie (110 ° ou 115 ° ou 120 °) ou montrer quelques oscillations pendant la durée de la stérilisation. Toutes ces minuscules variations interviennent pourtant de manière telle que des milieux préparés exactement selon la même formule nutritive et dans les mêmes conditions mécaniques et physiques, mais à des dates

différentes, ne possèdent pas obligatoirement la même valeur nutritive d'une fois à l'autre.

C'est pour cette raison que les bactériologues se sont préoccupés de formuler des prescriptions précises pour la préparation de milieux dits «Standards». Ils ont codifié les conditions thermiques dans lesquelles doit se passer l'incubation des cultures et la durée du séjour à l'étuve, en tenant compte des exigences particulières du matériel soumis à l'examen. Il y aura donc des mileux spéciaux et des prescriptions spéciales relatives à l'analyse quantitative de l'eau, à l'analyse du lait, à l'examen du beurre, du fromage, etc.

Le milieux standards, pour l'analyse de l'eau, seront des milieux gélosés, gélatinés, silicatés, etc.: pour l'analyse du lait et de ses dérivés on se servira de préférence des milieux au lait-gélosé, au petit-lait agarisé, au lait dextriné, ou encore des innombrables milieux en poudre (Difco, Oxoïd, etc.)

Les conditions thermiques standards varient également en raison du produit à examiner. Pour l'analyse de l'eau, il convient de laisser incuber à 20 °—21 °, pour le lait à 30 ° pour le dénombrement des microbes pathogènes à 37 °, pour celui des microbes thermophiles à 55 ° tandis que le mise en évidence des microbes psychrophiles exige des températures plus basses, températures variant entre 5 ° et 10 °.

La durée standard de l'incubation dépend et du matériel ensemencé (eau, lait . . .) et du milieu employé et surtout de la température de séjour dans le thermostat.

Mais il faut bien dire, il n'existe pas qu'un milieu standard pour chaque produit à examiner, mais plusieurs. Aussi les résultats quantitatifs obtenus selon les milieux standards employés ne sont pas, de façon absolue, comparables. Il faut donc pour chaque résultat de dénombrement indiquer la méthode utilisée et les prescriptions-standards suivies.

Il y aurait, soit dit en passant, un grand chapitre à rédiger sur l'impérieuse nécessité d'uniformiser les méthodes-standards elle-mêmes, de n'en choisir qu'une parmi elles et une seule pour chacun des produits à analyser. Ainsi les résultats seraient comparatifs — dans les limites de variations des expériences d'ordre biologique — d'analyse à analyse, de laboratoire à laboratoire, aussi bien en Chine qu'au Paraguay, à Genève qu'à Chicago. Mais il ne peut s'agir là que d'un voeu pie, chaque auteur affirmant «unguibus et rostro» que sa méthode est l'unique procédé-standard possible dont la valeur et la simplicité dépassent de 100 coudées les techniques proposées par d'autres micrographes. Comme on ne peut contenter tout le monde et son père, la plupart des «Congrès de microbiologie» ont décrété la standardisation de plusieurs méthodes, mises au point par différents spécialitstes ès-dénombrements, dont les résultats ne semblaient pas être trop éloignés les uns des autres. Quelques tentatives d'unification des méthodes ont été effectuées aux Etats-Unis et en divers pays. Mais souvent l'on s'en tient à un nationalisme scientifique étroit et chaque pays propose la méthode qu'il a officiellement adoptée dans ses laboratoires d'Etat. Mais ceci, comme disait l'écrivain anglais, est une autre histoire . . .

La numération

La numération des germes visibles sur les plaques peut être conduite soit

a) à l'oeil nu
b) à la loupe
c) au microscope.

Chacune de ces techniques comporte, pour leur utilisation, des conditions précises relevant du nombre total des colonies qui se sont développées dans le substratum nutritif.

Technique usuelle

La technique habituelle se basse sur le principe que *Koch* a, le premier, établi. Le matériel à analyser est porté dans les plaques choisies (Petri ou plaques similaires) au moyen d'une pipette débitant $\times$ gouttes au ml. Le matériel est introduit soit directement dans la plaque, soit dans le tube du milieu préalablement fondu lequel, une fois ensemencé, sera versé dans la boîte. Après brassage pour effectuer le mélange substratum-matériel, les plaques sont laissées en position horizontale sur une surface froide ou sur une table réfrigérante, afin que la solidification s'opère rapidement; après quoi l'on transporte les cultures à l'étuve où on les laissera à la température appropriée, le nombre de jours nécessaire.

Technique de Massol (35) (1894)

Au lieu de plaques de Petri, *Massol* se sert de tubes à essais de fort calibre (25 mm de ϕ), terminé à leur partie supérieure par une tubulure bouchée à l'ouate. Ces tubes contiennent, comme milieu quelques centimètres de gélatine nutritive. Après avoir liquéfié la gélatine au bain-marie à 30 °, on l'ensemence à raison d'une goutte de volume connu du produit à analyser. Puis, tandis que la gélatine est encore fluide, on incline les tubes et on les dépose à l'étuve à 22—23 °, sur tréteaux à encoches, où l'on peut les empiler les uns sur les autres. La méthode des plaques se trouve ainsi heureusement modifiée pour l'analyse quantitative. On obtient ainsi une surface du substratum nutritif suffisante et on peut laisser les tubes longtemps à l'étuve sans craindre ni les contaminations possibles par les poussières extérieures, ni la dessiccation rapide du milieu, chaque tube étant capuchonné au caoutchouc. Cette obturation s'oppose à l'évaporation de l'eau de condensation et transforme l'éprouvette en une véritable chambre humide.

Technique de Burri (36)

Le procédé de *Burri,* employé pour l'analyse quantitative des microbes du lait, utilise des tubes de gélose solide (gélose au petit-lait dilué peptoné) suffisamment ferme et dont la surface doit être sèche au moment de l'ensemencement. Le milieu employé est donc un milieu solide à la surface duquel on porte le matériel à analyser ou moyen d'une anse de platine calibrée. L'oeillet chargé est avancé dans le tube jusqu'à un centimètre au-dessus du centre de la surface du substratum

où l'anse est posée: puis sans arrêt marqué, on la fait glisser en ligne droit le long de la surface jusqu'à environ 5 mm du fond du tube. On retire ensuite l'anse en décrivant à la surface du milieu une série de stries serrées pour distribuer sur toute la largeur du tube le produit à analyser. Après le temps d'incubation recommandé, on dénombre les colonies qui, toutes, ont cultivé en présence d'air, en surface.

Technique de Frost (37)

La technique de *Frost* est une combination ingénieuse de la méthode d'examen direct de *Breed* et de la méthode indirecte de *Koch*.

Elle consiste essentiellement en une culture sur lame porte-objet dont le dénombrement des colonies est effectué sous le microscope. Voici comment procède l'auteur, avec les modification apportées per *Clarenburg* (38), pour la numération des bactéries du lait:

a) sur une lame porte-objet on dessine 2 rectangles de 2,5 cm de longueur sur 2 cm de largeur. La surface de chacun d'eux est donc de 5 cm². On place la lame, après stérilisation dans la flamme d'un bec Bunsen, sur un bain-marie aux environs de 45 °, ou sur une platine chauffante.

b) au moyen d'un pipette stérile de 0,1 ml de contenance on dépose 0,05 ml de lait sur chacun des 2 carrés. L'échantillon de lait à analyser a été préalablement agité afin d'obtenir une bonne dispersion de la matière grasse. A l'aide d'une pipette stérile on emplit de 10 ml de lait un tube à essai, fermé d'un bouchon à l'émeri, stérilisé. Puis on brasse énergiquement le tube affin de disséminer et de scinder en leurs éléments constituants les conglomérats bactériens.

c) on ajoute ensuite à chaque goutte de lait une quantité égale de gélose liquide, maintenue aux environs de 42 ° à 45 °.

d) on mélange alors, aussi intimement que possible, le lait et la gélose à l'aide d'un fil de platine et l'on étend le liquide sur la surface totale de chacun des carrés. De ce fait chaque mm² reçoit 0,0001 ml de lait.

e) la lame ainsi préparée est immédiatement placée sous une cloche stérile, au frais, à la glacière par exemple, pour hâter la solidification.

f) la préparation est portée ensuite dans une chambre humide à l'étuve, à température convenable (27 ° à 30 ° pour le lait) où on la laisse incuber.

g) après 24 heures déjà, le dénombrement peut être effectué. Il suffit alors de fixer la préparation par immersion dans une solution d'acide acétique à 5 %, après l'avoir séchée è 90 °, puis de la colorer par la thionine phéniquée.

h) on compte les colonies décelées dans 20 champs, choisis, de préférence, sur les deux diagonales du rectangle, et cela pour chacun des rectangles, et l'on calcule le chiffre moyen des colonies trouvées dans un champ microscopique. L'on partira de ce nombre moyen qui, multiplié par 10 000, donnera le nombre de germes au ml.

Utilisation des M. F. (membranes filtrantes) portées sur divers milieux de cultures

Cette méthode peut être utilisée aussi bien quantitativement que qualitativement.

La littérature concernant cette technique originale, quant à sa valeur et à sa précision, est, dès 1949 *(Kruse)* (39) à nos jours, extrèmement abondante (plus de 350 références à ce sujet).

Disons, d'ores et déjà, que les conclusions des innombrables expérimentateurs, quant à la rapidité et à l'exactitude des résultats, sont des plus disparates, dissemblables autant que variées, voire absolument contradictoires. Elles différent grandement selon l'optique des analystes et de leur propre technicité individuelle qu'ils ne sauraient laisser assumer complétement, même une laborantine spécialisée.

La méthode

La méthode, que *Novel* et *Burkard* (40) ont décrite point par point dans cette même revue (1959), repose sur l'emploi:

a) d'un dispositif semblable à un appareil à filtrer sous vide, muni de deux entonnoirs, facilement interchangeables, de capacité différente: 50 ml et de 750 ml, et préalablement stérilisés.

b) de membranes filtrantes à caractéristiques bactériologiques (Co Göttingen ou autres), préalablement stérilisées, portées sur une plaque en métal poreux, également stérile.

c) de la filtration de la quantité de matériel liquide (eau, lait, suspensions microbiennes, etc.) à analyser, sous vide *peu* poussé.

Après filtration, l'on dispose la membrane, sans la retourner, sur le milieu nutritif approprié. L'incubation à l'étuve, à la température adéquate, varie de 18 heures à plusieurs jours selon les auteurs.

Les colonies sont alors dénombrées soit à l'oeil nu, soit à la loupe, soit encore au microscope à faible grossissement.

Dans un prochain article, relatif aux propositions de la commission de bactériologie et d'hygiène des chimistes cantonaux et municipaux de Suisse, nous aurons l'occasion de mettre en relief la valeur comparative de toutes ces diverses méthodes, en raison même de leur emploi dans les analyses bactériologiques des diverses denrées alimentaires.

Nous n'avons pas l'outrecuidance de croire que nous avons effectué une revue complète de tous les procédés — et surtout de leurs variantes — qui ont été proposés jusqu'ici. Notre intention était plus modeste et nous nous sommes contenté de faire mention d'un certain nombre de méthodes qui, classiques ou originales, sont utilisées le plus fréquemment en technique bactériologique en vue de déterminer le nombre de germes dans un produit quelconque.

Résumé

L'auteur, après une introduction générale, passe en revue les différentes méthodes de numération des germes microbiens, à savoir celles utilisant l'examen microscopique direct,

celles employant les cultures en milieux liquides et enfin celles usant des cultures en milieux solides.

L'examen microscopique direct comporte plusieurs modalités: examen à l'état frais entre lame et lamelle ou en chambre hématimétrique; examen après dessiccation et coloration, examen à l'ultramicroscope.

Les méthodes utilisant les milieux liquides, aussi nombreuses que variées, sont encore en usage soit aux Etats-Unis, soit en France, notamment pour la colimétrie des eaux ou le dénombrement des entérocoques.

L'auteur cite également les diverses techniques de dénombrement employant la culture sur milieux solides, en Petri, en tubes ou sur membranes filtrantes.

Summary

Review of various methods of bacterial plate count, either by direct microscopy or in liquid or solid media.

Zusammenfassung

Uebersicht über verschiedene Methoden zur Bestimmung der Keimzahl, entweder durch direkte Mikroskopie oder in flüssigen oder festen Medien.

Bibliographie

1. *Miquel:* Analyse microbiologique des eaux. — Rev. d'hyg. 1887, p. 725. — Analyse des eaux. — Rev. d'Hyg. 1888, p. 391. — L'analyse bactériologique des eaux. — La médecine mod. 1890, p. 855. — Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux. — Paris, Gauthier-Villars, 1891.
2. *Prucha:* Comment les microbes s'introduisent-ils dans le lait et comment peut-on en déduire le nombre?. — J. of Dairy Science, 1920, p. 208.
3. *Inerney:* Clarification du lait. — Cornell Univ., Agric. Exper. Station, Bull. 389, 1917.
4. Choix d'un milieu pour la numération des germes microbiens. — Le lait, 1938, p. 225.
5. *Dorner:* La durée de la décoloration à l'épreuve de la réductase est-elle fonction de la teneur bactérienne du lait? — Le lait, 1933, p. 595. — Le payement du lait selon la qualité — Festschr. z. 75jährig. — Jubiläum d. landw. Schule Strickhof, Zürich, Ruegg 1928. — Le laitier rom. et j. suisse du lait., 1928, Nos 6 à 11. — Microbiologie laitière, lib. Payot, Lausanne 1952.
6. *Leroy:* Concours de lait propre. — Le lait, 1938, p. 448.
7. *Macy:* Quelques observations sur la teneur bactérienne du lait desséché. — J. of Dairy Science, 1928, p. 516 à 526.
8. *Ward:* Les bactéries thermophiles et l'outillage de la pasteurisation. — Cherry Circle, 1926, vol. 10, p. 7.
9. *Fabian, Olson* et *Fay:* Une méthode d'examen microscopique du beurre. — J. of Dairy Science, 1935, p. 603—604. Le lait, 1936. — Etude de l'influence de l'homogénéisation sur la flore bactérienne, dans la préparation de la crème glacée. J. of Dairy Science, 1925 vol. 8, p. 246. — L'influence des manipulations industrielles sur la teneur bactérienne de la crème glacée. — Agric. Exper. Station Michigan, Agric. College, Bac-

teriolog. Section, Techn. Bull, 1923, p. 24. — L'hygiène et le contrôle de la crème glacée: un aperçu de leur progrès. — The Ice Cream Trade Journal, Mai 1932. — La teneur bactérienne de certaines crèmes glacées du Kansas. — J. of Dairy Science, 1923, p. 283.

10. *Fajermann* et *Damme:* Le pouvoir bactéricide du sang; sa mesure et sa valeur en clinique — Presse médicale, 1938, t. l, p. 829.
11. *Cohn:* Contribution à l'étude de l'influence du mouvement des eaux sur la vitalité et la virulence des germes que ces eaux contiennent. Giorn. della R. soc. italiana d'igiene 1904, p. 313, 361. — R. Hyg., 1904 p. 1026.
12. *Hirt:* Principes des méthodes d'examens directs de l'eau. — Z. Biol. 1879, 15. — Expertise microscopique de l'eau. — R. d'Hyg. 1879 p. 768.
13. *Eberle:* La numération des germes dans les aliments habituels du nourrisson. Z. Bakt. Orig. 19, 2, 1896, p. 2.
14. *Hueppe:* Etude hygiènique sur l'eau potable au point de vue biologique. — Schillings Journal, 1887.
15. *Winterberg:* Les méthodes de numération bactérienne. Z. Hyg. 1898, t. 29, p. 75.
16. *Liebreich:* Deutsche med. Wochenschrift, 1916, p. 453.
17. *Henriques:* Technique de la numération des bactéries. — C. R. Soc. de Biol. 1923, 88, p. 819.
18. *Bonifas* et *Novel:* Numération directe des bactéries. — Annales de l'inst. Pasteur No 1480 juil. 1952 t. 83, p. 142.
19. *Koch:* Du nombre des bactéries contenues dans l'eau. — Mitteil. aus d. Kaiserl. Ges. Aut. 1881, Ed. 1, 36.
20. *Klein:* Une nouvelle méthode de numération microscopique des bactéries. — Zbl. Bakt. Orig., t. 27, 1900 p. 834.
21. *von Hehewerth:* La méthode de numération microscopique de Klein et quelques-unes de ses applications. — Arch. Hyg., 1901 t. 39 p. 324.
22. *Wright:* Méthode de numération directe des bactéries «Lancet», 1902, No 7 p. 11.
23. *Pozzi-Escot:* A propos d'une nouvelle méthode de numération directe des microbes du lait. Le lait, 1934, p. 494.
24. *Breed:* L'exactitude des calculs du nombre des bactéries dans les échantillons de lait. — J. of Dairy Science, 1921, No 1 Vol. 4.
25. *Demeter:* Directives pour l'exécution du contrôle bactériologique du lait. — Le lait, 1936, p. 138. — Méthodes bacteriologiques et biologiques de recherches. — H. Milchw., 1930, p. 372. — Techniques d'examens du lait. — Abd., Abt. 12 Tl. 2, 1. Hlfte. — Directives pour l'examen bactériologique du lait. — Deutsch. Molkerei Zeitsch., 1934, p. 1953—1955. — La bactériologie en beurrerie en tenant compte surtout de la fabrication. Molkerei Z., 1937, t. 51 p. 105, 141, 171.
26. *Skar:* Une méthode rapide et exacte de numération des bactéries, des leucocytes ... Skandinavisk veter. Tidskrift, 1912, p. 219. z. f. — Fleisch und Milchhyg., 1913, p. 301. Z. f. Bakt., 1922, p. 826.
27. *Pien* et *Baisse:* Sur la numération directe des microbes du lait. — Le lait, 1931, t. 11, p. 705.
28. *Knaysi* et *Ford:* Une méthode de numération des bactéries vivantes dans le lait au moyen du microscope. — J. of Dairy Science, 1938, vol. 21, p. 129—142.
29. *Anne Marie Ronchese:* Procédé de numération directe des germes dans les suspensions microbiennes. C. R. Soc. de Biol., 1940 vol. 133, p. 190.
30. *Ammann:* La numération directe des bactéries de l'eau au moyen de l'ultramicroscope. Z. Bakt. II, 1911, t. 29, 381.

31. *Chauveau* et *Arloing:* Analyse des eaux. — R. d'Hyg., 1888, p. 473.
32. *Fol* et *Dunant:* Nouvelle méthode pour le transvasage de bouillons stérilisés et le dosage des germes vivants contenus dans l'eau. — Arch. sc. phys. et nat., Genève, juin 1884, p. 557.
33. *Halvorson* et *Ziegler:* Application des méthodes statistiques aux problèmes bactériologiques. J. of Bacteriology, 1932, t. 23, p. 101.
34. *Standard Methods* and Wastewater, for the examination of Water eleventh edition, 1961, Amer. publ. Health assoc. New-York, Broadway, 1790.
35. *Massol:* Les eaux d'alimentation de la ville de Genève. — Genève, impr. Aubert-Schuchard, 1894.
36. *Burri:* Les cultures en stries en vue de la numération des germes. — World's Dairy Congress, London 1928, Report p. 690—696. — Les cultures en stries pour remplacer les cultures sur plaques. — Le lait, 1929, p. 1028. — L'importance des méthodes de recherches simples en bactériologie laitière. — Le lait, 1934, p. 1016.
37. *Frost:* La méthode de numération des bactéries du lait au moyen de petites plaques. — Intern. Assoc of Dairy and Milk Inspectors, Washingt. 1920.
38. *Clarenburg:* Observations systématiques sur la valeur des petites plaques de Frost pour la détermination des bactéries vivantes dans le lait. Le lait, 1927, p. 321.
39. *Kruse:* Gesundheits-Ingenieur, 70, 154, 1949.
40. *Novel* et *Burkard:* A propos de l'analyse colimétrique des eaux par la méthode des membranes filtrantes. Ces Trav. **50**, 188 (1959). — De la limite de précision de la méthode utilisant la technique des membranes filtrantes. Ces Trav. **50**, 292 (1959).

Zum Zinngehalt verschiedener Gemüsekonserven

Von *A. Blumenthal* und *J. Glättli*
Aus dem Zentral-Laboratorium des Migros-Genossenschafts-Bundes (MGB), Zürich

1. Einleitung

Weißblechdosen spielen als Verpackungsmaterial für Lebensmittel schon seit langem eine sehr wichtige Rolle. Deren vielseitige Verwendbarkeit ist auf diverse hervorragende Eigenschaften zurückzuführen und nicht zuletzt auch auf den Schutzüberzug durch Verzinnen. Je nach Art der Füllgüter werden zwar verschieden große Mengen von Zinn herausgelöst, sie galten aber bis vor kurzem als in gesundheitlicher Hinsicht für unbedenklich. Nun mehren sich in jüngster Zeit die Stimmen, die für den Zinngehalt von eingedosten Lebensmitteln obere Toleranzgrenzen festlegen möchten. Einige Länder haben auch bereits amtliche Vorschriften erlassen, wie nachfolgende Tabelle zeigt (1).