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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 60 (1969)

Heft: 2

Artikel: Du rôle des dilutions préalables dans l'analyse bactériologique quantitative des denrées alimentaires

Autor: Novel, Emile

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982481

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

Du rôle des dilutions préalables dans l'analyse bactériologique quantitative des denrées alimentaires

Par *Emile Novel*
(Service d'hydrobiologie et de microbiologie des denrées alimentaires)
Institut d'hygiène, Genève

Introduction

Lorsque le matériel à analyser quantitativement, qu'il s'agisse d'eaux de consommation, minérales ou autres, qu'il s'agisse de laits (de commerce, pasteurisés, upérisés, etc....), de crèmes, de beurre ou de n'importe quel produit alimentaire pouvant être excessivement riche en micro-organismes (de quelques millions ou de milliards de bactéries au ml) l'on peut avoir recours à deux procédés *(Novel* [1]):

1° *à l'examen microscopique direct.* Dans ce cas l'on dénombrera la totalité des microbes, sans faire de distinction entre les microbes morts et les microbes vivants;

2° *à la numération indirecte* après culture, en ayant fait préalablement la dilution du matériel à ensemencer:

dans un tel cas l'on ne pourra compter que les bactéries *vivantes,* susceptibles de se reproduire dans le milieu (ordinaire ou spécial) et les conditions (pH, température, aérobiose, anaérobiose, etc.) choisis.

En admettant donc, comme cas particulier, que le nombre des micro-organismes soit fortement élevé, l'on se trouve dans l'obligation soit d'effectuer des dilutions très poussées du matériel initial, soit d'examiner ou d'ensemencer des volumes très réduits du produit à analyser.

Si, dans le cas de numération *indirecte,* nous inoculions *directement* le matériel, les colonies seraient si nombreuses dans le substrat nutritif qu'il serait *impossible,* par quelle méthode que ce soit, de les compter. En diluant préalablement le matériel — et l'on peut pousser les dilutions aussi loin qu'on le désire, au 1/100 000 000 000 si l'on veut — il sera toujours possible de choisir, parmi les diverses séries ensemencées, l'une d'entre elles où les colonies microbiennes se rencontreront suffisamment dispersées pour que le dénombrement soit facile et exact, quant au nombre des colonies comptées, du fait de la *pauvreté relative* en germes des Petri de cette série.

Nous sommes beaucoup plus limités — quant à l'ordre de grandeur de la «dilution» — si l'on ensemence le milieu au moyen de volumes minuscules du produit à analyser quantitativement. Il n'existe guère, en effet, de pipettes qui débitent avec exactitude moins de 0,01 ml, soit 1/100 de ml par goutte.

L'anse de platine, la plus précise, calibrée «ad hoc», ne dépose jamais moins d'un milligramme ou d'un millimètre cube de la substance à «quantitativer» microbiennement (*Burri* [2]).

Si la suspension contenait, par exemple, 10 millions de germes au ml, nous ensemencerions 100 000 germes au moyen d'une seule goutte de la pipette au 1/100, et 10 000 micro-organismes au moyen de l'anse calibrée prélevant un millimètre cube, tandis que poussant les dilutions au 1/10 000, au 1/100 000 ou encore au 1/1 000 000, nous ne déposerions que 1 000, 100 et seulement 10 germes, en utilisant, pour l'inoculum, 1 ml de chacune des dilutions bactériennes respectives.

Il est évident que l'on peut combiner les deux méthodes et pratiquer de très fortes dilutions et ne porter en culture qu'un volume extrêmement minime (1/100 ou 1/1 000 de ml) de ces dilutions.

Nous allons examiner plus particulièrement le procédé des dilutions préalables. Prenons, tout d'abord, comme constat expérimental, les données théoriques suivantes: une suspension microbienne comporte *50 millions de germes* au ml: nous aimerions la diluer de façon telle qu'il n'y ait plus dans ce matériel de départ, que *5 microbes* au ml. Il suffit donc, mathématiquement parlant et pour arriver à ce résultat, de diluer la substance initiale 10 millions de fois. Il ne faut pas oublier, cependant, que le *mode de dilution* influence — et de beaucoup — les résultats des dénombrements: des dilutions faites directement à un taux élevé (1/1 000 par exemple) fournissent des valeurs numératives, comme l'ont démontré *Régnier* et *Lambin* (3), moins satisfaisantes que les dilutions graduelles (1/10—1/100—1/1000 . . .).

Nous nous arrangerons donc de telle façon que chaque dilution successive soit dix fois moins riche en bactéries que la précédente.

Nous établirons en conséquence une suspension au 1/10, puis 1/100, une troisième au 1/1 000, la quatrième au 1/10 000 et ainsi de suite jusqu'à obtenir une dilution *réelle* au 1/10 000 000.

Si nous ensemencions chacune des dilutions, nous devrions parvenir aux résultats — arithmétiques — suivants:

dilution au 1/10	5 000 000 germes au ml
dilution au 1/100	500 000 germes au ml
dilution au 1/1 000	50 000 germes au ml
dilution au 1/10 000	5 000 germes au ml
dilution au 1/100 000	500 germes au ml
dilution au 1/1 000 000	50 germes au ml
dilution au 1/10 000 000	5 germes au ml

Tout se passerait donc, théoriquement, selon le raisonnement mathématique le plus strict, et l'on aurait à louer autant la perfection du procédé technique que l'habileté de l'opérateur.

Or, *en pratique,* notre schéma est complétement bouleversé, comme nous allons le démontrer plus avant. Il y a de *très grandes variations* dans les chiffres obtenus, et l'on s'aperçoit que les résultats expérimentaux n'ont aucune mesure et ne

concordent que très imparfaitement à ceux que l'on était en droit de prévoir et d'attendre.

Très bref rapport historique à ce propos

Peu d'auteurs se sont occupées, jusqu'ici, de ce problème fondamental qui, pourtant, mérite une très spéciale mention.

C'est *Ruata* (4) qui, en 1904 déjà, a attiré l'attention des chercheurs sur le fait qu'en diluant une eau de réseau très contaminée le nombre des germes décelés, après ensemencement, est toujours et régulièrement *le plus élevé* dans la dilution poussée le plus loin

De ses expériences personnelles, *Ruata* arrive à cette conclusion pertinente autant que drastique, que les dilutions au 1/100 000 donnent des résultats de *15 000 à 60 000 fois supérieurs,* quant au nombre de micro-organismes, à ceux des suspensions initiales.

Clauditz (5) fait les mêmes constatations, *Hesse* et *Niedner* (6) font également les mêmes remarques au sujet des dilutions.

En 1924, *Muntsch* (7) a repris le problème point par point: il arrive, lui aussi, à la conclusion que le nombre des germes d'une suspension microbienne est d'autant plus élevé que plus grand est le *taux* de la dilution employée pour l'ensemencement.

Schubert (8) (1943) relève que ses expériences personnelles sur la question controversée des dilutions lui ont permis de conclure que dans le 85 % des cas il y avait une *augmentation croissante du nombre des micro-organismes* en fonction du taux de la dilution.

Selon nous (*Novel* [9], [10]), il ne s'agit que d'une matérialité technique relevant de la méthode employée pour le pipettage afin d'effectuer, aussi consciencieusement que possible, les dilutions.

De quelques modalités techniques préliminaires

Avant d'aborder le problème des dilutions en lui-même, il convient de mettre en évidence quelques facteurs, d'ordre technique, qui peuvent intervenir comme causes essentielles et indiscutables d'erreur.

Ces facteurs, on se doit de les éliminer d'emblée. Ils apporteraient, en effet, des fluctuations telles dans les résultats du dénombrement des germes après dilution qu'il serait absolument impossible de déterminer les causes réelles des variations qui rendent, à elles seules déjà, le problème des dilutions si difficile à résoudre.

A. Pipettes et anses calibrées

Le premier souci du technicien s'occupant plus particuliérement du dénombrement des micro-organismes dans un produit alimentaire donné est de posséder un matériel irréprochable qui lui permette de mesurer avec exactitude des quantités minimes de liquide.

Les pipettes. — Les pipettes employées usuellement sont des pipettes d'un ou deux ml de contenance, dont la graduation peut être divisée en dixièmes, en vingtièmes ou même en centièmes de ml.

Or, ces pipettes sont calibrées pour une température donnée et pour un liquide donné: ce liquide est communément l'eau distillée. Dès lors l'on voit qu'il peut y avoir une cause d'erreur — d'ailleurs systématique — si l'on utilise sans correction de telles pipettes à n'importe quelle température, pour le pipettage soit de lait, soit de crème, soit d'eau physiologique, soit encore de beurre fondu, etc. S'il est relativement facile de ramener un liquide quelconque à une température constante, disons de 15 ° pour préciser, il n'est point possible de travailler, à n'importe quel moment de l'année dans une atmosphère externe — celle du laboratoire — qui soit à cette tempèrature fixe et immuable. Il est évident que toutes les analyses conduites dans le même lieu et le même temps seront comparables. Elles cesseront pourtant de l'être d'un jour à l'autre, d'un lieu à l'autre, d'autant plus qu'il faudrait tenir compte — si l'on veut faire preuve d'un rigorisme strict — du facteur pression.

Les anses calibrées. — Nombre d'expérimentateurs parmi lesquels nous pouvons citer *Conn (11), Singer* et *Hoder* (12), *Miller* (13), *Dorner* et *Demont* (14), *Novel* (9), *Oberzill* (15) préconisent pour mesurer des volumes réduits de liquide, notamment de lait, l'emploi d'anses (öse) calibrées.

L'anse présente, en effet, l'avantage de prélever *rapidement* une quantité minime de liquide de l'ordre du milligramme ou du millimètre cube.

Mais pour que l'anse reste un instrument de précision, il faut, comme l'ont montré *Dorner* et *Demont* (14) en prendre un soin tout particulier afin que l'oeillet ne se déforme pas (manipulation brusque, flambage exagéré) et éviter, *par des rinçages soigneux,* l'adhésion de particules organiques qui, formant sur le platine un carbure qui le désagrège, le rend rugueux et cassant, modifie plus ou moins la surface du fil et, par conséquent, la dimension de l'anse et, de là, la quantité de liquide prélevé par adhésion.

Mais il est évident que l'anse adsorbe — de même que les parois des pipettes d'ailleurs — un certain nombre de bactéries. Il n'est pas absolument certain, d'autre part, que la totalité du volume emprisonné par l'oeillet s'échappe entièrement de l'anse et se mélange facilement et complétement au milieu de culture (bouillon, gélose, gélatine, etc.) auquel on l'incorpore.

Les anses calibrées l'emportent peut-être sur les pipettes, en ce sens qu'elles permettent la mesure des quantités voisines du millimètre cube alors que les pipettes les plus précises et offrant toute garantie d'exactitude ne peuvent mesurer, au minimum, que 0,01 ml. Les anses calibrées sont, de plus facilement stérilisées par un simple flambage rapide au rouge.

Des techniques de dilutions

Deux possibilités s'offrent pratiquement à l'expérimentateur lorsqu'il veut diluer une suspension microbienne quelconque: il peut réaliser ses dilutions direc-

tement à un taux élevé d'emblée (1/1 000 à 1/10 000) ou, au contraire, arriver à une dilution du même ordre par dilutions graduelles.

Pour obtenir, par exemple, une dilution au 1/1 000, l'on peut porter un ml du liquide original dans 999 ml du véhicule de dilution ou pour atteindre cette même dilution au 1/1 000, l'on peut effectuer des *dilutions successives* en passant, par exemple, du liquide de départ à une suspension 1 au 1/10; puis à une dilution 2 (à partir de 1) au 1/100; puis enfin à une dilution 3 (à partir de 2) au 1/1 000, et ainsi de suite si on le désire.

Ces deux méthodes de dilution ont-elles la même valeur? Si l'on dilue un matériel directement à un taux élevé, l'on peut craindre, à juste titre selon nous, que *l'exactitude des volumes mesurés* ne soit en défaut, Car s'il est relativement facile de prélever un ml, au moyen de pipettes de précision appropriées, il est bien plus difficile et certainement *moins exact* de mesurer 9999 ml, voire 999 ml, avec une précision atteignant 0,01 ml.

Et quand bien même l'on serait certain d'arriver à *une telle exactitude,* l'on serait pratiquement limité par la grandeur des récipients (stérilisés au préalable) à utiliser (1 litre, 10 litres, etc.). L'on serait tout aussi limité, de plus, par l'impossibilité technique qu'il y aurait alors à mélanger intimément, avec une certitude de dispersion suffisante, le liquide à diluer dans le véhicule de dilution. Il y aurait grand'chance à ce que les micro-organismes ne soient pas également et uniformément répartis dans la totalité du volume final.

Si l'on considére la technique utilisant les dilutions graduelles et successives, la mesure exacte de petites quantités de liquide est facilement réalisable. *Mais il suffit toutefois, d'une faute de pipettage en un point quelconque de la série pour que toutes les dilutions ultérieures soient entachées d'erreur, puisque les dilutions sont dépendantes les unes des autres.*

Les nombreux auteurs qui se sont occupés du problème sont unanimes à reconnaître que le procédé des dilutions successives donne des résultats plus constants et moins entachés de variations, souvent extrèmement marquées, que la méthode des dilutions effectuées directement à un taux élevé (*Régnier* et *Lambin* [16], *Novel* [9]).

Comment obtenir une homogénéisation uniforme des germes à chacune des dilutions?

Lorsqu'on pratique des dilutions successives, il importe au premier chef d'obtenir une distribution aussi mathématique que possible, des éléments microbiens apportés par la suspension initiale — ou le produit brut à analyser — dans le liquide, stérile, de dilution.

Or, comment réaliser cette dispersion uniforme?

De façon habituelle on assure le mélange après avoir porté 1 ml du matériel à examiner quantitativement dans 9 ml d'eau distillée (ou physiologique, s'il y a lieu) pour obtenir une dilution de 1/10, en aspirant et refoulant le liquide à plusieurs reprises dans la pipette dont on se sert pour effectuer la dilution. Cette

technique est-elle suffisante pour assurer une dilution aussi parfaite que possible des constituants?

Immédiatement, d'ailleurs, un nouveau problème technique se pose à l'opérateur: faut-il aspirer ou refouler le liquide plusieurs fois? De ce fait la quantité qui reste adhérente aux parois après vidange de la pipette — quantité qui est en plus du ml exact — peut être entraînée, ainsi que les germes qui s'y trouvent; elle est toutefois remplacée par une quantité égale du liquide à la dernière vidange, lors du refoulement.

Mais, ce faisant, est-on certain, (ce que nous aurions désiré) d'avoir «amalgamé» sinon la totalité mais tout au moins la maximale partie des bactéries adsorbées aux parois de la pipette elle-même, ou, au contraire, en aspirant et refoulant successivement le liquide dans *la même pipette* n'a-t-on pas plutôt permis à de nombreux micro-organismes — suspendus jusque là dans la première dilution — d'être retenus par la surface interne du verre ou d'être «agglutinés» par des microbes déjà adhérents à la pipette?

Il faut donc, *de manière absolue,* se résoudre à utiliser *une technique immuable* qui, quelles que soient les fautes systématiques qu'elle puisse entraîner par ailleurs, soit employée d'une façon rigoureusement semblable tout au long des différentes examens bactériologiques quantitatifs que l'on veut pouvoir comparer. (*Novel* [9]).

Le problème des dilutions

Nous n'envisageons point de détailler par le menu les investigations expérimentales qui ont été faites par nous-même (*Novel* [9]) et par *Oberzill* [15] dans son monumental exposé sur la question (Mikrobiologische Analytik, vol. de 520 pages, 1967).

Il me suffit de mentionner quelques expériences qui démontrent, de façon péremptoire, que le nombre des germes augmente avec le taux des dilutions.

Expérience 1

La suspension microbienne de départ fut préparée en introduisant 0,05 ml d'Escherichia coli typique en culture jeune de 6 h dans 200 ml d'eau distillée stérile. Après une homogénéisation d'1 minute 30″, afin de disperser les germes dans le liquide de dilution, 5 Petri pour *chacune* des séries, furent ensemencés avec 0,05 ml pour *chacune* des dilutions, en gélose préalablement liquefiée. Après brassage — afin de mélanger intimement le substratum nutritif aux germes et assurer ainsi leur parfaite dispersion — et après solidification du milieu de culture — les plaques furent placées après l'habituelle incubation de 15 jours à l'étuve, à 20—21 ° et dénombrées le quinzième jour.

Tableau No 1

No d'ordre	Dilution	Nombre de germes par plaque 1	2	3	4	5	Total	Moyenne	Coefficient de variation	Nombre de germes au ml	Le nombre de germes est obligatoirement compris entre
0	Originale	760	566	770	742	696	3 534	706,8	10,6	14 136	11 802—14 590
1	1/5	160	128	148	139	148	723	144,6	8,6	14 460	13 217—15 703
2	1/10	76	80	85	86	107	434	86,8	12,3	17 360	15 218—19 502
3	1/100	7	16	10	6	12	51	10,2	35,3	20 400	13 200—27 600
4	1/1 000	1	2	1	1	1	6	1,2	33,3	24 000	16 000—32 000
5	1/10 000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Les chiffres bruts — nombre de germes au ml — montrent une progression régulièrement croissante au fur et à mesure que le taux de la dilution est plus élevé. Il n'y a rien là qui doive nous étonner, semble-t-il, si l'on s'en rapporte aux expériences de la plupart des auteurs qui se sont jusqu'ici occupés du problème.

Si nous tenons compte du facteur pollution aérienne, (*Novel* [18]) nous obtenons les résultats suivants:

Tableau No 2

No d'ordre	Dilution	Total des germes (5 plaques)	Pollution possible	Nombre de germes en tenant compte de la pollution	Nombre de germes au ml en tenant compte de la pollution
0	Originale	3 534	2	3 532	14 128
1	1/5	723	2	721	14 420
2	1/10	434	2	432	17 280
3	1/100	51	2	49	19 600
4	1/1 000	6	2	4	16 000

Nous voyons que là encore, bien que nous ayons envisagé partout une contamination d'origine externe, le nombre de germes au ml augmente sensiblement avec le taux de la dilution. En ce qui concerne la série 4, la correction détermine une nette diminution du nombre des germes; il passe, en effet, de 24 000 à 16 000. Or, dans ce cas particulier les 6 colonies dénombrées appartenaient morphologiquement à Escherichia coli. Repiquées et identifiées, toutes donnèrent les réactions biochimiques du colibacille typique. La correction ne s'imposait donc pas.

Il résulte de ces constatations que le facteur pollution externe ne peut être rendu responsable à lui seul du phénomène d'augmentation du nombre des micro-organismes en fonction du taux progressif de la dilution.

Expérience 2

La suspension microbienne de départ à été constituée par le mélange de 0,1 ml de culture jeune (6 h) de colibacilles à 100 ml d'eau distillée stérile. La numération fut conduite à l'oeil nu. La suspension originale, trop riche en germes, n'a pas été dénombrée.

Tableau No 3

No d'ordre	Dilution	Nombre de colonies 1	2	3	4	5	Total	Moyenne	V*	Nombre de germes par ml	Le nombre des germes est certainement compris entre
1	1/10	323	331	275	340	228	1 557	311,4	8,1	62 280	57 760— 66 800
2	1/100	44	30	34	47	32	187	37,4	17,6	74 800	63 000— 86 600
3	1/1 000	2	6	3	6	8	25	5	48	100 000	60 800—139 200
4	1/10 000	1	1	3	1	0	6	1,2	81,6	240 000	88 000—392 000
5	1/100 000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* V = Coefficient de variation

L'examen du tableau ci-dessus nous montre, une fois de plus, que l'augmentation du nombre de germes dans l'unité de volume va de pair avec le taux de plus en plus élevé de la dilution.

Si nous considérons les valeurs probables du nombre des germes de chacune des séries, nous pouvons établir facilement — *mais arbitrairement* — un tableau qui ne montrerait que peu de fluctuation entre les diverses séries de dilutions, en prenant pour base le nombre de germes trouvés dans la série 1.

Nous aurions alors:

dilution 1/10	62 280
dilution 1/100	63 000
dilution 1/1 000	60 800
dilution 1/10 000	88 000

Seule la dilution au 1/10 000 se signalerait par une élévation appréciable du nombre des germes, mais qui serait toutefois bien loin d'atteindre les 240 000 bac-

téries au ml, valeur poutant la plus probable. Mais ce mode de faire porte en lui-même sa condamnation puisque, pour chaque série nous avons dû recourir au nombre probable minimum. Si, au contraire, nous avions utilisé le nombre probable maximum nous aurions obtenu une élévation constante du nombre des germes en fonction du degré de la dilution.

Envisageons également le rôle de la pollution externe:

Tableau No 4

No d'ordre	Nombre de germes	Pollution externe possible	Nombre des germes en tenant compte de la pollution externe et de la dilution
1	1 557	2	1 555 × 4 = 62 200
2	187	2	185 × 4 = 74 000
3	25	2	23 × 4 = 92 000
4	6	2	4 × 4 = 160 000

Même en tenant compte de ce facteur, nous voyons, une fois de plus, que le nombre de germes est encore le plus élevé à la dilution la plus poussée.

Il résulte donc de ces expériences que:

1° Les dilutions les plus étendues d'un matériel de départ donnent toujours le résultat maximal. Autrement dit, le nombre des germes — calculés — d'une suspension microbienne quelconque est d'autant plus marqué que plus grand est le taux de la dilution.

2° En tenant compte de la pollution aérienne possible, l'on constate le même phénomène.

3° La variation du nombre probable des germes des diverses séries est d'autant plus grande que le nombre des colonies bactériennes mises en évidence sur chacune des plaques est moins élevé.

En effet, relevons à ce propos, que le coefficient de variation est, de façon générale, d'autant plus grand que le nombre des colonies comptées est petit. De ce fait, l'amplitude du nombre probable sera également d'autant plus importante que le coefficient de variation sera plus grand. Il découle de cette constatation qu'au-dessous d'un certain nombre de colonies par plaque la dispersion des résultats augmente de façon telle qu'il est, alors, très difficile de se prononcer sur la valeur probable des chiffres obtenus. *Dorner* et *Demont* (14) ont montré, sur la base de l'erreur moyenne et du coefficient de variation, que pour obtenir un résultat relativement exact le nombre des colonies à dénombrer sur un Petri ne devait pas être inférieur, en moyenne, à 25. De même les bactériologistes américains ont fixé,

pour les même raisons, à 30 la limite inférieure du nombre des colonies pour le dénombrement des germes sur Petri.

En conséquence, on ne doit pas prendre en considération les séries de dilution ne comportant pas, pour 5 plaques, un minimum de 125 colonies, au total.

Expérience 3

La suspension de départ a été réalisée par l'inoculation d'une anse de platine de culture (âgée de 14 h) de colibacilles dans 10 cc d'eau distillée stérile. Chaque plaque a été ensemencée de 0,05 ml de la suspension microbienne. Incubation à 20—21 ° durant 15 jours.

Tableau No 5

Série	Dilution	Plaques 1	2	3	4	5	Total	Moyenne	Coefficient de variation	Nombre de germes au ml	Le nombre des germes est certainement compris entre
0	Originale	1 091 638 (n. m.)								21 832 770	10 916 355—32 750 155
1	1/10	177 200 (n. m.)								35 440 000	34 021 400—37 858 600
2	1/100	32 720 (n. m.)								65 440 000	62 822 400—68 057 600
3	1/1 000	3 660 (n. m.)								73 200 000	70 272 000—76 128 000
4	1/10 000	307	310	325	301	353	1 596	319,2	5,8	63 840 000	60 520 000—67 160 000
5	1/100 000	19	21	17	23	25	105	21	13,3	42 000 000	37 000 000—47 000 000
6	1/1 000 000	1	0	0	0	0	1	0,2	200	4 000 000	0—12 000 000
7	1/10 mil.	0	0	0	2 m	0	0	0	0	0	0— 0
8	1/100 mil.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0— 0

n. m. = numération microscopique m = moisissure

Les divers dénombrements ont été effectués les quinzième et seizième jour. Pour les séries 0, 1, 2 et 3 nous avons dû avoir recours à la numération microscopique, en raison du nombre très élevé de colonies par plaque. Pour les séries 4, 5, 6, 7 et 8 nous avons procédé à la numération macroscopique, numération comportant le dénombrement de toutes les colonies visibles sur les plaques.

Avant d'interpréter les résultats, il convient de se demander si l'on peut comparer les résultats obtenus par la numération microscopique à ceux que fournit la numération macroscopique (*Novel* [17]).

Valeur des résultats obtenus par la numération microscopique

Dans chacune des séries inspectées par dénombrement microscopique, nous avons choisi la plaque qui, parmi les 5 ensemencées, présentait la meilleure distribu-

tion macroscopique des colonies. Chaque «plaque-étalon» de chacune des sèries a été examinée microscopiquement par la méthode linéaire*. Chaque numération comportait le dénombrement de 40 champs microscopiques.

Série 0. — La densité coloniale était telle, dans la plaque-étalon de cette série, que nous avons été obligé de dénombrer les colonies en usant d'un oculaire quadrillé et ne compter les colonies visibles que d'un quart de champ. Il suffit alors de multiplier le chiffre trouvé par 4 pour obtenir le nombre de colonies par champ. Nous avons démontré que ce mode de faire pouvait entraîner, pour un résultat isolé, une erreur maximale de 200 %. Comme il s'agit là d'un dénombrement comportant l'inspection de 40 champs microscopiques et non d'un seul l'on peut évaluer l'erreur à ± 50 %. Le nombre le plus probable est de 21 832 770 colonies. En admettant une erreur probable de 50 %, nous voyons que le résultat peut être compris entre 10 916 355 et 32 750 155.

Série 1. — En ce qui concerne la série 1, le dénombrement a été effectué par l'inspection microscopique de 40 champs, en comptant toutes les colonies visibles dans chacun des champs. Nous savons* qu'en opérant ainsi, l'erreur maximum possible est de ± 4 %. Le nombre probable de germes est donc compris entre 34 021 400 et 37 858 600, avec pour valeur la plus probable 35 440 000 germes au cc.

Série 2. — Etant donné que l'inspection microscopique comporte 40 champs, et que l'erreur maximale possible est de 4 %, nous obtenons comme valeurs probables 62 822 400 et 68 057 600 et comme valeur la plus probable 65 440 000.

Série 3. — La série 3 enfin, examinée dans les mêmes conditions que les séries 1 et 2, montre que le nombre des germes le plus probable s'élève à 73 200 000, les oscillations étant comprises entre 70 128 000 et 76 128 000.

En résumé, nous voyons que, même en tenant compte de la variation, l'amplitude d'oscillation du nombre probable de chacune des séries ne dépasse jamais celle de la série suivante. Nous sommes donc certains que l'augmentation du nombre des germes par unité de volume en fonction du taux de plus en plus poussé de la dilution est *un phénomène concret* correspondant aux faits et, en ce qui concerne la numération microscopique, il ne saurait y avoir d'interférences de résultats dus à la technique de numération.

Valeur des résultats obtenus par la numération macroscopique

Série 4. — Le nombre des colonies par plaque est compris entre 301 et 333 colonies. Cette série présente une grande stabilité, puisque le coefficient de variation n'atteint que 5,3. Nous savons (*Novel* [17]) de plus, qu'il ne peut y avoir, pour un tel nombre de colonies par Petri, aucune faute due au dénombrement. La chiffre de 63 840 000 germes par cc ne saurait être entaché d'erreur.

* Voir à ce sujet: Les techniques de numération bactérienne, au chapitre IX: La numération microscopique appliquée aux plaques de Petri, par *Em. Novel*, prix Davy 1942. Bibliothèque universitaire, Genève.

Série 5. — La sèrie 5 est également irréprochable, soit du point de vue technique, soit du point de vue mathématique. Elle comporte des plaques peu riches en colonies — donc facilement dénombrables — mais assez riches, cependant pour que les résultats ne comprennent pas une trop grande variation. Le résultat de 42 000 000 de germes au ml doit être tenu pour réel.

Série 6. — Das cette série, l'on n'a pu dénombrer qu'une unique colonie sur 5 plaques. Etant donné que le coefficient de variation est égal à 200 et que le nombre probable de germes peut être compris entre 0 et 12 000 000 de germes au ml, les résultats de cette série doivent être rejetés, puisque la probabilité est telle qu'elle ne permet aucune appréciation de l'exactitude du nombre de germes.

Séries 7 et 8. — Ne comportent aucune colonie de colibacilles. La série 7 a été polluée par des moisissures. Pourtant si l'on admet que le nombre de germes réel doit être de 60 000 000 environ, l'on aurait dû dénombrer, au total, 6 colonies sur les 5 Petri.

En résumé des 5 séries dénombrées par numération macroscopique, seules les séries 4 et 5 sont utilisables.

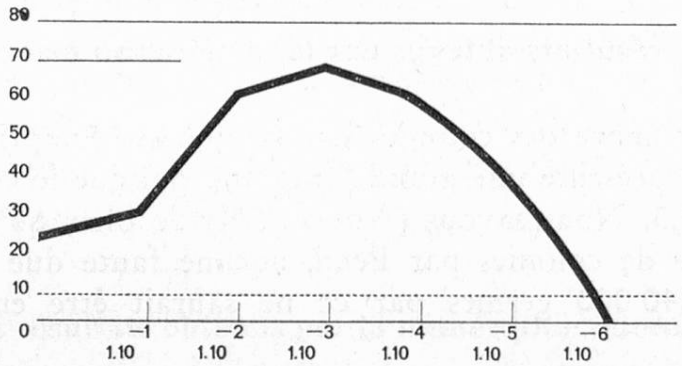
Conclusions relatives à la présente expérience

Etant donné que:

1. — Nous avons pris la précaution de rechercher mathématiquement dans quelle mesure la variation probable pouvait intervenir pour fausser la valeur des résultats et que

2. — la variation de chacune des séries n'interfère pas avec celle de la série suivante, l'on peut conclure et dire que les résultats, aussi bien ceux obtenus par numération microscopique que macroscopique, sont comparables.

Nous notons, pour la première fois, qu'après avoir suivi la règle générale d'augmentation en fonction du taux de la dilution, le nombre de germes s'abaisse progressivement pour tomber à zéro. Le schéma suivant le montre mieux encore que tout autre explication.



En ordonnée: nombre de germes par ml. En abcisse: dilutions

Nous ne voulons pas, ici, envisager encore, en détail, les 22 autres essais expérimentaux que nous avons effectués, au sujet du problème extrèmement complexe des dilutions (*Novel* [9]).

Considérations générales relatives au problème des dilutions

Avant de tirer les conclusions générales qui découlent de nos expériences relatives au problème des dilutions, relevons le fait, une fois encore, que nous nous sommes placé dans des conditions particulièrement favorables, expérimentales, standardisées en quelque sorte.

Nous avons tenté, en effet, dans la mesure où nous pouvions pratiquement le faire, d'eliminer la majeure partie des facteurs de variation imputable, le plus souvent, soit à une technique défectueuse, soit à des conditions relevant du matériel microbien utilisé ou à des impératifs culturaux. De cette façon, il nous a été plus facile de mettre en évidence chacune des causes qui étaient capables d'intervenir et de jouer un rôle plus ou moins important pour fausser, modifier ou rendre très délicate l'interprétation et de là, la solution efficace et réelle du problème.

Il nous a fallu, en conséquence, écarter, par des méthodes appropriées, les causes d'erreur dues:

a) au matériel (pipettes, flaçons ou Erlenmeyer, stérilisation de la verrerie, etc.);
b) à la technique des dilutions (dilutions pratiquées directement à taux élevé — dilutions graduelles);
c) à la technique de dispersion des germes (agitation simple, brassage au moyen des perles de verre);
d) de la nature du produit à diluer (eau, lait divers, crèmes, beurre, etc., matériel monomicrobien ou polymicrobien);
e) au mode de culture (substratum nutritif — pH — température — durée de l'incubation — nombre de Petri ensemencés — dilutions préalables ou non, etc.);
f) à la technique de numération (microscopique, macroscopique, etc.).

Résumons en peu de lignes de quelle manière nous avons pu y parvenir.

A l'encontre de certains expérimentateurs qui utilisaient comme matériel initial, soit de l'eau de consommation fortement polluée, soit de l'eau d'égout, soit du lait, etc., nous n'avons employé que des suspensions réalisées à partir d'une culture monomicrobienne. La souche «mère» était une culture d'Escherichia coli, type I fécal, espèce dont les individualités bactériennes ne formant habituellement ni chaînes, ni conglomérats, sont, en milieux liquides, parfaitement isolées les unes des autres.

Pour la préparation de chaque suspension, de chacune des dilutions, comme de chaque ensemencement, nous nous sommes servi d'*une nouvelle pipette stérile.* En opérant ainsi, l'on était certain de ne point apporter, *supplémentairement,* et

dans une proportion impossible à déterminer, des germes ayant adhéré aux parois des pipettes lors des manipulations antérieures.

Pour plus d'exactitude encore dans la réalisation des diverses suspensions diluées, nous n'avons appliqué que le procédé utilisant — à l'exclusion de tout autre — les dilutions graduelles passant successivement, de la suspension bactérienne originale à la dilution au 1/10, puis à celle au 1/100 (en changeant de pipette, bien sûr) et ainsi de suite.

Afin de distribuer les micro-organismes d'une façon aussi homogène que possible dans le véhicule de dilution, nous avons utilisé des billettes de verre qui, par brassage modéré — d'une durée suffisante pour assurer la répartition des germes, assez courte toutefois (1 minute 30″, au plus) pour qu'il n'y ait aucune multiplication, mais non brutale afin que les chocs ne déterminent pas la mort d'un certain nombre de microbes — assurait la parfaite dispersion des germes dans la totalité du liquide.

Pour chaque série d'expériences nous avons ensemencé (sauf indications expérimentales contraires) 5 Petri afin que l'on puisse établir *une moyenne* d'une approximation absolument valable et d'effectuer les calculs relatifs aux éléments biométriques de comparaison (déviation-Standard, coefficient de variation, etc.).

La numération a été conduite soit microscopiquement pour les plaques extrêmement riches en bactéries, soit macroscopiquement pour les Petri ne comportant qu'un petit nombre ou un nombre moyen de colonies microbiennes.

Etant donné que toutes nos recherches scientifiques ont été réalisées selon une technique exactement identique; que nous avons éliminé — pour autant qu'il était possible — tous les facteurs susceptibles de déterminer, des erreurs non systématiques, nos résultats offrent une garantie suffisante d'exactitude et de très bonne comparabilité.

Conclusions

Dans de telle conditions, nous sommes fondé à formuler les conclusions suivantes:

1° Lorsque le matériel de départ est relativement pauvre en micro-organismes (encore faut-il, «a priori», le savoir), le nombre de germes, *calculé,* augmente progressivement la fonction du taux de plus en plus élevé de la dilution. Il tombe ensuite brusquement à *zéro.*

2° Lorsque le matériel de départ est très riche en bactéries le nombre de germes, *calculé,* s'élève progressivement jusqu'à un *maximum* au fur et à mesure que les dilutions sont de plus en plus étendues. Ce nombre s'abaisse ensuite très rapidement, mais progressivement aussi, pour tomber, brusquement, à 0.

Le phénomène d'augmentation du nombre des microbes en raison des dilutions de plus en plus poussées dépend:

a) *du facteur pollution externe:* il peut jouer un rôle, *très important,* dans les séries où le nombre des micro-organismes, par Petri, *est bas.* Ce rôle est *négligeable* lorsque les séries comportent un nombre moyen ou un très grand nombre de micro-organismes par Petri.

b) du minimum de *substratum nutritif et d'espace,* dont a besoin chaque germe (quel qu'il soit, spécifiquement parlant) pour pouvoir coloniser.

Si les plaques comprennent un inoculat d'une très grande richesse en bactéries, de tous les germes introduits, lors de l'ensemencement, il n'en est qu'un certain nombre qui puisse former une colonie macroscopiquement visible à l'oeil nu, étant donné la *concurrence vitale* que se font les *différents individus* des diverses *espèces bactériennes présentes* dans un matériel polymicrobien.

Le phénomène de diminution du nombre des microbes dépend — sans aucune contestation possible — de l'adsorption et de la rétention des micro-organismes par les parois de verre, des tubes (ballons Erlenmeyer, etc.) contenant les différentes dilutions et des pipettes, utilisées lors des *prélèvements et des ensemencements ultérieurs.*

Ce phénomène est beaucoup moins sensible lors des premières dilutions où le matériel est très riche en bactéries — il ne paraît même pas se faire «sentir» quantitativement, bien qu'il ait forcément lieu* — que dans des dilutions très poussées où le matériel *dilué* ne comprend que quelques dizaines ou quelques microbes seulement par unité de volume.

Mais pourtant ces divers facteurs ne suffisent pas à expliquer les phénomènes d'augmentation et de diminution du nombre des germes. Dans les suspensions à faible concentration microbienne, il y a une *nette augmentation* du nombre des organismes bactériens sans que pour autant les facteurs pollution externe et «espace vital» puissent être vraisemblablement incriminés. La diminution brusque à *zéro* s'explique facilement par le fait que l'ensemencement n'apporte *aucune bactérie* (dilution trop poussée) et est, par conséquent, obligatoirement *stérile.*

L'on peut concevoir également — mais nous n'en avons pas fait la preuve expérimentale — que durant les multiples et innombrables manipulations (agitation directe, brassage ultérieur, pipettages, transferts, ensemencements, etc.) les individualités bactériennes, parfaitement isolées au début, s'associent parfois en groupes de quelques unités ou s'agglutinent en petits amas, qui ensuite peuvent se dissocier partiellement ou même complétement, pour s'agglomérer à nouveau au cours des diverses opérations techniques.

L'on peut même faire intervenir par surcroît, comme *Schubert* (8), la charge électrique des éléments, qui, agglutinés naturellement ou physico-mécaniquement, pourraient se libérer les uns des autres au cours des dilutions successives, se repousser s'ils sont de même signe, ou se conglomérer, dérechef, s'ils sont de signe contraire*. Encore faudrait-il, en ce cas, tenir compte de la mobilité propre des bactéries, s'il s'agit de microbes *mobiles.*

* Il faut relever que l'augmentation du nombre des germes parallèlement à l'augmentation du taux de la dilution est en opposition avec l'effet d'adsorption entraîné par les parois des pipettes.

* Les diverses espèces bactériennes, sont dans leur grande majorité, chargées négativement.

Etant donné l'intrication de ces innombrables et multiples facteurs divers autant que complexes dont l'action est souvent opposée et dont *la constance ou l'inconstance* n'est guére prévisible, il est extrèmement difficile de déterminer dans quelle mesure et dans quel sens ils interviennent — bien qu'ils interviennent inéluctablement — lors de numérations après cultures et après dilutions.

Si l'on étudie, du point de vue mathématique, la *fluctuation* des diverses séries en usant du coefficient de variation, nous remarquons, *valablement,* qu'un certain nombre d'entre elles ne sont pas utilisables du fait de l'amplitude énorme de la *probabilité valable* du nombre des germes dans l'unité de volume.

En pratique, *nous sommes absolument certain que le nombre de germes le plus acceptable, lors d'une série de dilutions successives, est celui que donne la série où l'on constate l'arrêt de l'augmentation progressive du nombre des micro-organismes bactériens,* pour autant que les Petri comportent de 30, au moins, à 700 colonies, au plus, par plaque.

Si nous acceptions des séries où les Petri comportent moins de 25 à 30 colonies par plaque, *la probabilité du nombre des germes est telle que l'erreur peut atteindre de 100 à 200 %.*

Si nous utilisons des séries où les plaques ont une richesse en germes de plus de 700 colonies, le dénombrement est techniquement difficile et peut-être entaché d'une erreur comprise entre 7 et 20 %.

Si, également, comme cela peut se présenter, *deux séries* offrent *réellement* des garanties suffisantes d'exactitude, l'on est en droit soit de prendre la moyenne des deux valeurs les plus probables, soit de considérer comme le plus proche de la réalité le résultat de celle des deux séries ayant le plus faible coefficient de variation (pour autant qu'on veuille bien le rechercher!!).

Pour terminer, dans tous les cas, il convient de se rappeler que les résultats obtenus n'ont qu'une valeur plus ou moins approchée et relative et qu'ils ne sauraient être en aucune façon, une *valeur absolument absolue.*

Il serait souhaitable, pour le moins, que l'on indiquât, pour chaque détermination quantitative, aussi bien les chiffres minima et maxima probables, que le nombre de germes le plus probable afin que le résultat donné ne comportât point qu'une valeur unique dont pourtant la rigidité mathématique implique une fallacieuse sécurité.

Résumé

L'auteur relève le rôle extrèmement important des dilutions successives dans la numération des germes microbiens, notamment lors de l'analyse quantitative de nombreuses denrées alimentaires.

Après une bréve introduction et un non moins bref rappel historique de la question, *Novel* montre que les problèmes techniques préliminaires (pipettes, anses calibrées, etc.) sont d'intérêt majeur et peuvent déterminer des erreurs quantitatives telles qu'elles atteignent parfois jusqu'à 200 %.

En définitive il convient de rappeler que les résultats obtenus, après dilution du matériel de départ, n'ont qu'une valeur approchée et qu'ils ne représentent jamais une valeur absolue.

Zusammenfassung

Der Autor weist auf den sehr wichtigen Faktor der aufeinanderfolgenden Verdünnungen bei der Keimzahlbestimmung hin, insbesondere bei der quantitativen bakteriologischen Analyse zahlreicher Lebensmittel.

Nach einer kurzen Einführung und einem geschichtlichen Rückblick wird vom Autor dargelegt, daß die technischen Vorarbeiten (Pipettieren, Abmessen usw.) von größter Bedeutung sind, weil daraus Fehler bis zu 200 % entstehen können.

Als Schlußfolgerung kann gesagt werden, daß die nach Verdünnung des Ausgangsmaterials erhaltenen Resultate einen nur angenäherten aber nie absoluten Wert darstellen.

Bibliographie

1. *Novel:* Les méthodes de numération des germes microbiens. Ces. trav. vol. 59, Heft 1/2, 127 (1968).
2. *Burri:* La culture en stries en vue de la numération des germes, Wold's Daisy Congress, London 1928, Report, p. 690—698.
3. *Régnier* et *Lambin:* De la méthode de numération microbienne basée sur le dénombrement des colonies développées sur milieux solides. Les dilutions de la suspension initiale sont-elles à rejeter? C. R. Soc. Biol. 1933, 114, p. 983.
4. *Ruata:* L'analyse quantitative appliquée au diagnostic bactériologique de l'eau. Zbl. Bakt. Or. II, 1904, p. 220 et 287.
5. *Clauditz:* Ein Beitrag zur Quantitativen Bakteriologischen Wasseruntersuchung. Hyg. Rundschau, 1904, p. 655.
6. *Hesse* et *Niedner:* Die quantitative Bestimmung von Bakterien in Flüssigkeiten. Z. Hyg. 1906, 53, p. 259.
7. *Muntsch:* Ein Beitrag zur Kulturellen Keimzählmethode. Zbl. Bakt. Or. I, 1929, 114, p. 438.
8. *Schubert:* Quantitative Bakteriologie. Zbl. Bakt. Or. I, 1942, 148, p. 399 et 1943, 149, p. 463.
9. *Novel:* Le rôle des dilutions dans la numération des germes microbiens. Thèse 1056. Fac. des sciences — Soc. genevoise d'éd. et d'impres., 1943, Genève.
10. *Novel:* De quelques causes d'erreur dans l'analyse bactériologique quantitative. Ces trav. 39, p. 245 (1948).
11. *Conn:* Public Mealth Rep. of U. S. Publ. Health Service. Vol. 30, p. 2349.
12. *Singer* et *Hoder:* Arch. f. Hyg., 1924.
13. *Miller:* Journ. of. lab. and Clin. Medecine, St-Louis, 1924, vol. 9. No. 6.
14. *Dorner* et *Demont:* Recherche sur le procédé de Burri de numération bactérienne par stries. Le lait, 1931, 11, p. 909 et 1005.

15. *W. Oberzill:* Mikrobiologische Analytik. Verlag Hans Carl. Nurnberg, 1967.
16. *Régnier* et *Lambin:* Contribution à l'étude des méthodes de numération des microbes. Dénombrement des colonies développées sur milieux solidifiés. Bull. Pharmacol. 1934, 36, p. 7. Etude sur le croît microbien en fonction de la qualité de substances nutritives des milieux de culture. C. R. Acad. Sc., 1938, p. 1263.
17. *Novel:* Les techniques de numération bactérienne. Prix Davy, 1942. Bibliothèque universitaire, Genève.
18. *Novel:* Dans quelle proportion les germes de l'air peuvent-ils polluer les plaques lors de l'ensemencement et durant l'incubation? Ces Trav. 1949, vol. 40, p. 255.

Rechtliche Bestimmungen über Zusätze zu Getreidemehlen in der Schweiz

B. Strahlmann
Institut für Lebensmittelchemie der Universität Bern

I. Kantonale Regelungen vor dem Erlaß des eidg. Lebensmittelgesetzes

Im Jahre 1406 wurde die in der Stadt Bern von der Obrigkeit angeordnete «Brotschau» zum erstenmal erwähnt (A. *Meier,* 1939). Die Brotschauer waren verpflichtet, das Brot, das in der «Brotschaal» — dem Brotmarkt — vor oder in den Häusern der Bäcker und auf dem Wochenmarkt verkauft wurde, qualitativ und quantitativ zu prüfen, ob es genügend ausgebacken und genügend groß war. Die Konsumenten sollten «pfennwert» kaufen, d. h. für ihr Geld auch genug und gutes Brot erhalten. Zunächst war die Größe der Brotlaibe veränderlich, während der Preis festblieb — in Zeiten der Getreideknappheit wurde also das Brot kleiner gebacken — bis 1622 nicht mehr nach der Größe, sondern nach dem Gewicht geschaut werden mußte. 1628 erließen die «Gnädigen Herren» der Stadt Bern eine kombinierte Preis- und Gewichtstabelle, die 1657 insofern verbessert wurde, als fortan jeder sehen konnte, was aus «ein Müt Dinkel zu fünf Mäß Kernen gerechnet» hergestelltes «ausgebacken, weißes, kreutzerwärtiges Brot» zu wiegen hatte. Nicht allein und nicht immer war den Käufern der wichtige Zusammenhang zwischen der Wasseraufnahme des Mehles und der Brotausbeute bekannt, der dem Bäcker stets einen Vorteil gegenüber den Kunden bot und den der Bäcker zu verbessern suchte.