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

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 63 (1972)

Heft: 2

Artikel: La numération microscopique appliquée aux plaques de Petri

Autor: Novel, Emile

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-982795

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: 16.07.2025

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

16. *Trautner K.: Enzymatische Zuckerbestimmungen.* Z. Ernährungswiss., Suppl. **8**, 40—45 (1969).
17. *Zonneveld H.:* Bestimmung von Vitamin C in Früchten, Fruchtsäften, Gemüse und Konserven nach der Methode nach Tillmans unter Ausschaltung reduzierender Stoffe. Z. Lebensmitt. Untersuch. Forsch. **119**, 319—333 (1963).
18. 31. Tätigkeitsbericht der Vereinigung Schweiz. Versuchs- und Vermittlungsstellen für Saatkartoffeln, Zürich 1967.
19. 32. Tätigkeitsbericht der Vereinigung Schweiz. Versuchs- und Vermittlungsstellen für Saatkartoffeln, Zürich 1968.
20. 33. Tätigkeitsbericht der Vereinigung Schweiz. Versuchs- und Vermittlungsstellen für Saatkartoffeln, Zürich 1969.
21. Pressey R. and Shaw R.: Effect of temperature on invertase, invertase inhibitor, and sugars in potato tuber. Plant. Physiol. **41**, 1657—1661 (1966).
21. *Pressey R.:* Changes in sucrose synthetase and sucrose phosphate synthetase activities during storage of potatoes. Am. Potato J. **47**, 245—251 (1970).

La numération microscopique appliquée aux plaques de Petri

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, voire d'eaux résiduaires, qu'il s'agisse de laits (de commerce, pasteurisés, upérisés, etc. . . .), de crèmes, de beurre ou de n'importe quel produit alimentaire — et il y a encore bien d'autres multiples applications dans le domaine de la microbiologie médicale notamment — pouvant être extrèmement riche en micro-organismes (de quelques millions ou de milliards de germes par ml), l'on peut avoir recours à diverses techniques, à savoir:

1. à l'examen microscopique direct. Dans ce cas l'on dénombrera la totalité des bactéries, 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;

3. à la numération directe après culture, mais sans dilution préalable obligatoire, par l'examen *microscopique* des boîtes de Petri. Dans les cas 2 et 3 l'on ne pourra compter, en conséquence, que les germes vivants, susceptibles de se reproduire dans le millieu nutritif (ordinaire ou spécial) et les conditions (aérobiose, anaérobiose, pH, température, etc.) choisis.

Nos lecteurs trouveront à ce propos toutes les modalités opératoires dans les articles que nous avons publiés dans les «Mitteilungen» dès 1947 à ce jour et plus particulièrement dans le travail intitulé «Du rôle des dilutions préalables dans l'analyse bactériologique quantitative des denrées alimentaires» (*Novel* 4).

Bref historique

La méthode relative au dénombrement selon la technique microscopique *après culture* des germes *microbiens* (au sens pastorien du terme) à été préconisée en 1886 déjà par *Wolfhügel* (2), puis par Neisser en 1895 (3). Dès lors durant une vingtaine d'années, mais très sporadiquement, l'on en fit mention de temps à autre: en 1901 à propos d'un opuscule de *Hehewerth* (6), puis de plusieurs publications de *Hesse* et *Niedner* (5), échelonnées de 1898 à 1906.

De cette date à maintenant, *néant,* si l'on excepte toutefois le traité de *Neisser* et *Klein* (3) paru en 1921, puis celui de *Heim* (7) qui en fait état dans la septième édition du «Lehrbuch der Bakteriologie» (1922).

Dès lors à ce jour *rien.* Il y a donc précisément 50 ans!

Pourtant cette méthode est tout à fait *valable, précieuse* et *rapide,* surtout si l'on veut gagner du temps, économiser le nombre de plaques de Petri, l'encombrement des étuves et éviter, de plus, l'écueil majeur des dilutions préalables avec tous les inconvénients que ce procédé comporte, comme nous l'avons amplement démontré antérieurement.

Mais, il faut le souligner, dans aucune des publications, dans aucun des ouvrages cités, le problème n'a été étudié du point de vue des principes statistiques. Jusqu'alors l'on n'a jamais mis en évidence les variations certaines des résultats quantitatifs en raison d'une programmation d'ordre mathématique permettant de connaître la moyenne, le médiane, les extrèmes, l'écart des extrèmes, l'écart type σ, le nombre le plus probable des germes, l'écart à la moyenne, etc. (*Novel)* (9).

Il a fallu attendre les travaux d'*Halverson* et *Ziegler* (11). Ces auteurs ont établi un grand nombre de formules — basées habituellement sur les logarithmes naturels — et des tables de probabilité qui permettent un calcul rapide du contenu microbien d'un matériel quelconque.

Les «Standard Methods» (12) proposent encore dans leur dernière édition de 1971 cette technique (most probable number ou M.P.N.) pour la mise en évidence du nombre des germes banals et le dénombrement des coliformes en particulier, toutefois en milieux liquides appropriés.

*

Nous verrons lors de nos prochains articles ce qu'il faut penser des diverses techniques proposées: à savoir les méthodes linéaire, circulaire et celle dite des «piqués».

Nous en avons fait le tour du point de vue expérimental et pratique, toujours au moyen du calcul des probabilités.

Il est certain que si nous voulons déterminer exactement le nombre des colonies macroscopiquement visibles sur une plaque (de Petri ou similaire) il est nécessaire de les compter une à une. Le total obtenu sera le nombre réel des colonies qui ont eu la possibilité, eu égard aux conditions de culture, de se développer dans la boîte.

Il est évident que nous ne pouvons compter, à l'oeil nu, qu'un certain nombre de colonies. Si la plaque est très riche en germes, il est impossible, pour des raisons aussi bien techniques que pratiques, de dénombrer macroscopiquement *toutes* les colonies. De plus, dès que les colonies sont très nombreuses — nous l'avons vu dans une publication antérieure — plusieurs d'entre elles arrivent parfois à confluer, ne formant ainsi qu'une colonie et, en conséquence, ne sont dénombrées que comme telle. Ces possibilités d'erreurs sont relativement fréquentes et les résultats obtenus sont, de ce fait, inexacts.

Nous avons vu aussi dans un précédent travail (*Novel* (1) que l'on ne pouvait compter avec certitude à l'oeil nu, pour autant d'ailleurs que la dispersion des germes soit assurée de façon satisfaisante dans la totalité du milieu, que 1400 colonies au plus.

Au delà il faut avoir recours à d'autres procédés. Pour parer à cette difficulté les microbiologistes s'aident, en vue du dénombrement microbien de plaques contenant de plusieurs centaines à plusieurs milliers de colonies, de loupes à grossissement modéré, de dispositifs ou d'appareils compteurs spécialement construits à cet effet, tels que ceux bien connus de *Wolfhügel* (2), *Lafar, Heyroth, Eschmarch* et d'autres encore.

Or dès que les colonies sont nombreuses, on ne peut plus les compter dans leur totalité. Il faut se contenter d'inspecter diverses portion de la culture, 10 à 20 cm² ou davantage; en considérant la somme des colonies dénombrées sur une surface donnée, on calcule combien il y a de colonies par centimètre carré. Multipliant ensuite le résultat par le nombre de cm² de la surface de la boîte, on arrive à déterminer le nombre de bactéries qui se trouvaient, à l'origine, dans le matériel ensemencé. Il n'est donc plus possible, de cette manière, d'évaluer avec une certitude absolue le nombre de germes: le chiffre obtenu ne sera qu' approché. Ce dernier sera d'autant plus près de la vérité que l'observateur se sera astreint à inspecter une plus grande surface de la boîte, en opérant par surcroît sur des points où les colonies seront denses et sur d'autres points où elles le seront moins. Il devra de plus choisir, arbitrairement mais judicieusement, et autant qu'il se peut proportionnellement, à la dispersion des groupements coloniaux dans le milieu, les endroits à compter. Le choix de la surface à parcourir, tout autant que celui des points à observer, est donc laissé à l'appréciation de l'expérimentateur, ce qui n'est pas sans amener des variations possibles dans le chiffre des colonies dénombrées et, de là, des fluctuations importantes quant au résultat final. Sur combien de cm² faut-il alors opérer pour obtenir une évaluation qui soit suffisamment exacte? C'est un des problèmes que nous allons résoudre par la méthode microscopique.

A l'aide de la loupe le maximum des colonies que l'on peut dénombrer sans erreur trop appréciable est au plus, selon *Neisser* (3), de 20 000 colonies par Petri de dimension usuelle. Il va sans dire que l'observateur ne comptera pas les 20 000 colonies une à une, ce qui lui demanderait plusieurs heures. Il serait d'ailleurs dans l'impossibilité matérielle et technique de le faire étant donné la densité des colonies. Il ne considérera que 10 à 20 cm^2 d'un Petri de dimension habituelle comportant une surface totale de 63,5 cm^2. Il s'agit donc d'un dénombrement partiel.

Si les colonies sont très nombreuses enfin, on devra avoir recours au microscope. Là encore, on ne comptera que les colonies d'un certain nombre de champs microscopiques. Puis, rapportant la surface du champ microscopique à celle de la surface de la plaque et après avoir tenu compte du nombre de champs microscopiques examinés, on obtiendra approximativement le nombre de colonies développées dans la boîte. La limite d'utilisation du dénombrement microscopique dépasse, *sans dilution*, un million de colonies par Petri ordinaire selon *Neisser*. Elle pourrait même atteindre 5 millions, si l'on en croit *Buchner, Longard, Riedling*.

Au délà, on est obligé d'avoir recours à la dilution du matériel à analyser avec tous les aléas que ce procédé comporte (*Novel*) (4).

Etat actuel de la question

C'est *Neisser* qui a introduit en technique bactériologique la méthode de numération microscopique après culture. Dans un mémoire fouillé, paru en 1895 déjà, il pose les bases fondamentales du procédé. *Neisser*, en collaboration avec *Klein*, a apporté quelques retouches à son travail initial en publiant dans l'encycpédie de *Kraus* et *Uhlenhut*, le chapitre consacré à la «Keimzählung» (1923). *Hesse* et *Niedner* (5) en 1906 se font les protagonistes de la numération dite «circulaire». Quelques micrographes avaient entrevu, il est vrai avant *Neisser* le parti que l'on pouvait tirer d'un procédé microscopique utilisant (3) les plaques, mais ils n'ont fait qu'effleurer le problème sans s'y arrêter. Citons parmi eux *Hehewerth* (6), *Heim* (7), *Fermi* (8).

Les conclusions principales auxquelles arrive *Neisser* sont les suivantes:

1. La numération des colonies ayant cultivé sur des plaques de grandeur usuelle et comptant au moins 1500 colonies est facilitée par l'emploi du microscope; l'erreur maximale est comprise entre $+ {}^1/_7$ et $- {}^1/_8$ en comptant 30 champs microscopiques.

2. Les erreurs que comporte la numération microscopique deviennent plus manifestes dans les boîtes ne comportant que 600 à 1500 colonies. Même en inspectant 60 champs microscopiques les erreurs peuvent être de $+ {}^1/_3$ à $- {}^1/_4$.

3. Lorsque les plaques ne comprenant qu'une espèce microbienne ne contiennent que 300 à 600 colonies, il faut compter 90 champs microscopiques: les erreurs sont de l'ordre de moins ou plus ${}^1/_2$. Un dénombrement effectué à la loupe, avec soin, donnera des résultats équivalents, même s'il s'agit de Petri moins riches en germes encore.

4. Toutes les erreurs mentionnées ci-dessus sont considérablement réduites par l'inspection d'un plus grand nombre de champs.

5. Lors d'expériences quantitatives, on ne doit pas pousser les dilutions très loin pour éviter que les plaques ne montrent que peu de colonies.

6. Les résultats de chaque numération microscopique doit comporter les renseignements suivants: température d'incubation, durée de séjour à l'étuve, grandeur du champ microscopique.

Nous voulons dans les chapitres suivants examiner ces diverses conclusions en utilisant pour l'étude des variations les méthodes de calcul actuellement employées, méthodes basées sur le calcul des probabilités et notamment sur celle des moindres carrés (*Novel*) (9).

Technique de la numération microscopique

Materiel

Microscope. — La numération microscopique des cultures sur plaques nécessite l'emploi d'un bon microscope que le micrographe réservera exclusivement à cet usage. Ce microscope doit posséder une platine suffisamment grande pour que, lorsqu'on examine la périphérie du Petri, celui-ci ne soit pas en équilibre instable et ne menace point de tomber à tout instant. De plus, la distance entre l'objectif et la colonne mécanique du statif doit être de 10 cm au moins, c'est-à-dire plus grande que le rayon des boîtes. Ainsi des Petri de 18 cm de diamètre, peuvent être encore utilisée pour le dénombrement microscopique.

Pour toutes nos numérations nous nous sommes servi d'un microscope *Leitz*, monté d'un objectif 2 et d'un oculaire 12 fois donnant un gossissement de 72 fois, le tube étant tiré à 17 mm. Le champ microscopique était dans ce cas de 7,065 mm^2. Pour plus de sûreté nous avons mesuré, au moyen de l'oculaire-micromètre et de l'objectif-micromètre, la grandeur de divers tests, afin de vérifier les indications que comportait la tabelle du microscope. Cette précaution s'est avérée excellente, car nous nous sommes aperçus que plusieurs des oculaires 12 x ne donnait pas le diamètre du champ microscopique indiqué par la tabelle. En cherchant le corps du délit — car nous étions loin de mettre en doute les renseignements de la firme Leitz — nous avons pu découvrir la cause mystérieuse de cette non concordance. Pour nettoyer les lentilles des oculaires, un préparateur, aussi conciencieux que mal inspiré, les avait dévissées, puis soigneusement débarassées de leurs particules de poussière et remontées, les unes à l'endroit — comme il se devait — d'autres à . . . l'*envers ! ! ! De plus,* le diaphragme interne de l'oculaire n'étant pas obligatoirement au centre du tube, il s'ensuivait une différence appréciable quant à la surface du champ microscopique, ce qui ne nuisait en rien à la netteté des préparations, mais augmentait l'aire examinée dans des proportions assez sensibles.

Plaques. — Il convient de mesurer, au millimètre près, le diamètre interne des boîtes de Petri (godet interne). Pour les numérations microscopiques, nous avons réservé un lot de plaques d'un diamètre de 90 millimètres exactement,

rejetant toutes celles d'un diamètre légèrement supérieur ou inférieur. Ce choix préalable nous a permis de calculer plus facilement le nombre de colonies par plaque, puisque la surface de chacun des Petri était de ce fait strictement identique. Si nous avions employé des boîtes de diamètres divers, 8,6, 8,7 ou 9,1, 9,2 cm, par exemple, il aurait fallu prendre garde chaque fois à la surface du Petri et nous aurions eu, en regard du champ microscopique, des rapports différents selon les boîtes. En nous tenant uniformément à un type de plaque dont le diamètre comportait invariablement 9 cm, nous savions qu'il comprenait 900 fois le champ microscopique (surface dela boîte = 63,5 cm^2 divisée par la surface du champ microscopique = 7,065 mm^2 = 900 fois).

La numération

On dénombre toutes les colonies visibles dans le champ. Si une colonie chevauche sur 2 champs, elle n'est comptée pour une unité que si plus de sa moitié se trouve dans le champ inspecté. En ce qui concerne les colonies confluentes, si l'on peut réellement croire à leur confluence, il faut les compter pour deux colonies séparées.

Lorsqu'on examine un grand nombre de champs, 200 par exemple, l'on divise la plaque en quatre secteurs, par deux diamètres se coupant perpendiculairement. On dénombre 50 champs microscopiques dans chacun d'eux, en ayant soin de ne pas compter 2 fois le même champ, bien entendu. En opérant de cette façon l'on inspecte la plaque dans toute les parties de sa surface.

Si l'on ne dénombre qu'une quantité minime de la surface, 20 à 30 champs seulement, la question qui se pose, une fois de plus, est de savoir dans quelle portion de la boîte il vaut mieux faire la numération? Faut-il procéder à une inspection rapide de la plaque entière, puis proportionnellement, selon la répartition plus ou moins régulière des colonies dans le substratum nutritif compter ça et là dans les lieux arbitrairement choisis un certain nombre de champs? Faut-il opérer sur les champs de l'extrême bord toujours riches en germes et compter également la portion centrale de la plaque plus pauvre, en général, en microorganismes? Faut-il enfin diviser la boîte en de nombreux secteurs ou s'en remettre au hasard pour le choix des champs microscopiques? Autant de points d'interrogation que nous allons tâcher d'éliminer, si faire se peut, expérimentalement.

La difficulté principale du dénombrement réside, techniquement parlant, dans l'inégale répartition des colonies dans le milieu, aussi bien en surface qu'en profondeur. En effet, lorsque les colonies sont particulièrement nombreuses, on ne peut les mettre au point toutes en même temps dans le même champ microscopique. Il faut les dénombrer plan par plan. Mais il en est qui «chevauchent» ces plans: la même colonie, si elle est volumineuse, peut être visible dans 2 ou 3 plans; pour peu qu'il y ait quelques-unes de ces grosses colonies par champ, la difficulté de la numération s'accroît et son exactitude absolue devient problématique.

Au surplus, lorsqu'on examine des plaques comportant plusieurs espèces microbiennes, il convient d'inspecter minutieusement toute l'épaisseur du milieu,

principalement les premiers plans proches de la surface où l'on trouve souvent un très grand nombre de colonies minuscules, même microscopiquement, colonies que les auteurs américains ont nommé «colonies en tête d'épingle».

Il y a donc également dans la numération microscopique une limite, quant au nombre des colonies que l'on peut compter par champ, que l'on ne doit pas dépasser. Il est possible, il est vrai, de n'inspecter qu'une partie du champ microscopique, une moitié ou un quart, un huitième même, en se servant d'un oculaire quadrillé. On ne considère alors qu'un secteur du champ. Par voie de conséquence, le résultat calculé par champ ne sera déjà qu'approximatif, les secteurs comportant plus ou moins de colonies les uns que les autres.

Essai expérimental

Cet essai expérimental comporte l'ensemencement de 5 Petri de 90 mm de diamètre au moyen d'une suspension d'Escherichia coli type fécal I (0,5 ml d'une culture de 10 h. en bouillon nutritif ordinaire, diluée dans 200 ml d'eau distillée stérile) à raison de 0,05 ml de cette suspension par plaque. Nous avons choisi celle de ces 5 plaques qui présentait, à l'oeil nu, la meilleure répartition des colonies dans la totalité du substratum nutritif. Nous en avons fait l'étude détaillée en inspectant minutieusement un grand nombre de champs microscopiques. Cette plaque que nous désignerons sous le nom de plaque-étalon nous servira de guide en vue de la mise au point de la technique même de l'inspection microscopique.

Etude de la plaque-étalon. — Le dénombrement des colonies visibles au microscope, après 15 jours d'incubation à 20 °—21 °, a donné pour 180 champs, regardés, un total de 4950 colonies microbiennes, soit une moyenne de 27,5 colonies par champ. Le Petri comprend, au total, 900 champs. Il suffit donc d'appliquer la règle de 3 suivante $\frac{4950 \times 900}{180}$ pour obtenir le nombre de colonies développées sur la plaque, soit 24 750. Nous allons supposer — mais nous insistons sur le fait qu'il ne s'agit que d'une supposition dont la probabilité est sérieuse, mais non d'une réalité mathématique — que ces 24 750 colonies représentent le chiffre *exact* contenues dans la boîte. Partant de cet axiome nous allons tenter de résoudre le problème suivant: combien de champs suffit-il de dénombrer pour obtenir un résultat final qui ne soit pas entaché d'une erreur trop grossière?

Si nous comptions les 900 champs de la plaque, il n'y aurait aucune erreur théorique possible, Encore faudrait-il une boîte carrée et un champ microscopique carré recouvrant exactement 900 fois la surface du Petri (carré).

Une plaque ordinaire ronde et un champ microscopique ordinaire habituel donnent obligatoirement des interférences de champs et en voulant à tout prix dénombrer les 900 champs microscopiques, l'on serait obligé de compter plusieurs fois la même portion d'un même champ. De plus, la numération exigerait un temps *énorme,* par trop disproportionné au résultat à acquérir. Pour dénom-

brer 200 champs, en effet, d'environ 100 colonies par champ il faut de *6 à 7* heures d'examen. Il faudrait donc consacrer près des *30* heures, sinon davantage, pour compter toutes les colonies d'une *unique* plaque. Si cela est théoriquement possible, cela est pratiquement irréalisable et impensable en routine courante.

Mais l'on peut affirmer, en revanche, que plus on dénombre de champs microscopiques pour le même examen, plus le résultat devient proche du chiffre exact, pour autant toutefois que le nombre de colonies contenues dans un champ soit suffisamment élevé ou, tout au moins que la plaque ne comporte pas trop de champs vierges de toute colonie.

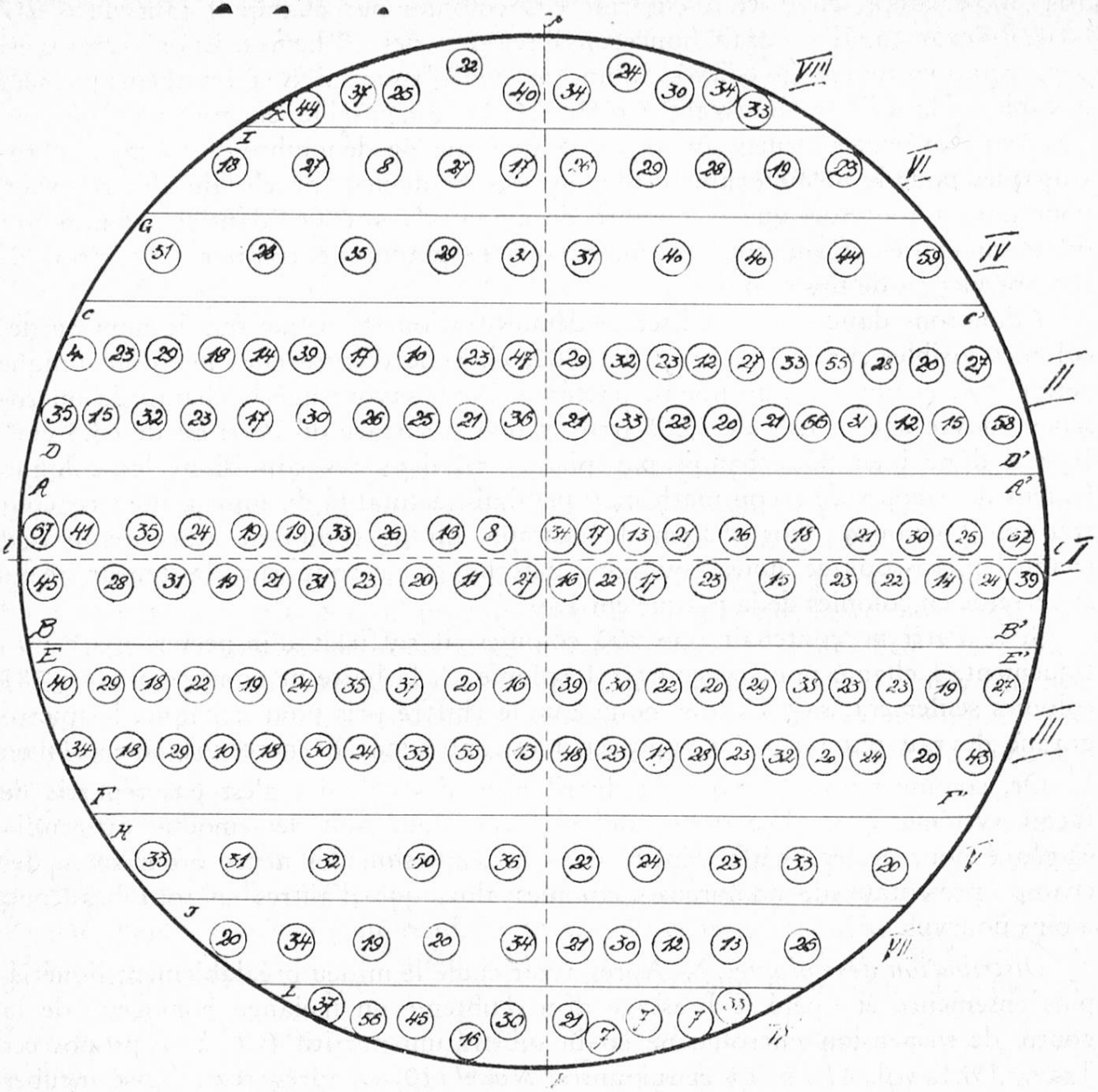
Admettons donc pour faciliter le démonstration théorique que le nombre des colonies visibles sur le Petri soit de 1800, chacune d'entre elles née d'un unique germe isolé et non d'un groupe de bactéries. Nous savons que le champ du microscope couvre une surface de 7,065 mm² et que la surface du Petri est de 63,5 cm². Il y a donc bien 900 champs par plaque. Si dans ces conditions les colonies étaient distribuées de façon mathématique dans la totalité du milieu, nous rencontrerions 2 colonies dans chacun de champs. En ne comptant alors qu'un seul champ microscopique nous pourrions déterminer, à coup sûr, la teneur réelle et certaine en colonies de la plaque entière.

Si le Petri ne contenait que 900 colonies, il suffirait d'inspecter, mathématiquement, 1 champ pour rencontrer 1 colonie. Si la boîte ne comprenait que 180 colonies seulement, soit 10 fois moins que le chiffre pris pour exemple, le micrographe devrait parcourir 5 champs en moyenne avant de percevoir une colonie.

Or, comme nous le savons, la distribution des colonies n'est pas répartie de façon systématique: il persiste toujours, quel que soit le «modus operandi» employé pour éviter l'hétérogénéité dans la dispersion des micro-organismes, des champs présentant de nombreuses colonies alors que d'autres en sont beaucoup moins pourvus.

Distribution des colonies. — Après avoir coulé le milieu préalablement liquéfié, puis ensemencé et opéré le brassage afin d'obtenir un mélange homogène de la goutte de suspension microbienne et du substratum nutritif (Cf. à ce propos ces Trav., 1971, vol. 42., p. 41 et suivantes, *Novel* (10) et après avoir laissé incuber les plaques à l'étuve (20 °—21 °) durant les 15 jours nécessaires, nous avons choisi et examiné le Petri-étalon.

Macroscopiquement la boïte montrait une distribution des colonies parfaite. *Microscopiquement* nous avons trouvé des champs plus riches en colonies que d'autres. Mais en aucun point de la plaque nous n'avons décelé de champ microscopique vierge de tout ensemencement: 7 a été le minimum de colonies visibles dans un champ, soit dans une surface de 7,065 mm²; l'extrême bord de la plaque possède une richesse coloniale supérieure à la partie centrale de la boïte. De façon générale cette dernière constatation se vérifie dans tous les cas, quelle que soit la technique utilisée pour effectuer le mélange micro-organismes — substratum et quelle que soit la richesse en bactéries de la suspension. Qu'il y ait peu ou beaucoup de colonies dans un Petri, bon nombre d'entre elles adhèrent au verre. Ce fait n'a rien qui puisse surprendre. En effet lorsqu'on brasse le



Numération linéaire. Chaque cercle représente un champ-microscopique. Chaque chiffre indique le nombre de colonies par champ.

milieu afin de dissémimer les germes, chaque vague successive déferle contre les parois de la boîte; le mouvement renouvelle les surfaces de contact du milieu avec la plaque qui le contient, ce qui a pour conséquence de permettre aux adhésions moléculaires de s'opérer entre le solide — la plaque de Petri en l'occurence — et un nombre de plus en plus élevé de molécules du liquide. Les germes peuvent alors coller aux parois de façon telle qu'ils ne peuvent plus s'en détacher ensuite. C'est pour cette raison que l'on trouve à la partie périphérique de la boîte un nombre de germes supérieur à celui des parties plus centrales de la plaque; il n'y a d'ailleurs réellement que les champs microscopiques tout proches du bord

même qui soient, relativement, plus riches en colonies que les autres champs; un coup d'oeil à la figure de la page précédente (8) permet de nous en convaincre aisément. Nous pouvons donc admettre avec une certitude légitime que la plaque-étalon soumise à l'examen comporte une bonne dispersion microscopique des colonies et qu'elle convient parfaitement et exactement à l'étude que nous désirons faire.

Examen microscopique du Petri choisi comme étalon. Examinons maintenant de plus près encore les résultats obtenus par le dénombrement de la plaque-étalon.

La numération a été conduite selon le mode de faire ci-après: la plaque a été divisée par des traits tracés à l'encre à même la boîte en 9 secteurs (voir tableau de la page 268) numérotés I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII et IX. Chacun de ces secteurs a été inspecté en partant du bord gauche de la plaque jusqu'au bord droit, et cela parallèlement au diamètre transversal l—l. Nous avons compté 40 champs microscopiques dans les secteurs I, II et III et 10 champs, dans les secteurs IV, V, VI, VII, VIII et IX.

Nous avons donc parcouru la totalité de la surface de la plaque, aussi bien dans sa périphérie qu'au centre. Dans la partie médiane de la boîte 1 champ sur 2 environ était examiné (1—0—1—0 . . .) ce qui nous a permis de parcourir la boîte le long du diamètre longitudinal sur la gauche et sur sa droite. Dans les parties à surface plus restreinte, notamment dans les secteurs IV à IX, nous avons examiné chaque champ à la suite l'un de l'autre. De cette manière toutes les portions du Petri ont été inspectées selon le mode que nous appellerons linéaire.

Nous avons collationné dans la tableau de la page 270 le nombre de colonies vues dans chacun des 180 champs. Au total nous arrivons à 4950 colonies, soit à une moyenne de 27,5 colonies par champ. Nous avons calculé ensuite les valeurs comparatives (voir page 271) afin d'avoir une base sérieuse d'appréciation pour les recherches à venir.

Le *minimum* des colonies décelé a été de 7: le *maximum 67* par champ.
L'*écart* des *extrêmes* est donc de *60*.
L'écart-type σ a une valeur de *11,07*.
Le *coefficient de variation* est égal à *40,25*.
La *déviation-standard* moyenne est de *0,826*.
La *médiane* se trouve à *25,50*.

Si nous admettons que la valeur probable de la moyenne est certainement comprise entre *plus ou moins 2 σm*, nous obtenons les valeurs de

25,86 comme *minimum*
29,14 comme *maximum*
27,50 comme *valeur la plus probable*

Au point de vue du nombre des germes les chiffres limites sont, en conséquence, compris entre 23 274 et 26 226 avec 24 750 comme valeur la plus probable. (*Novel*) (9).

Nombre de colonies par champ-microscopique
Denombrement des 180 champs de la plaque-étalon

	Secteurs									
	I		II		III		IV	VI	VIII	
	A	B	C	D	E	F	G	I	K	
1	67	45	42	35	40	34	51	18	44	
2	41	28	23	15	29	18	28	27	37	
3	35	31	29	32	18	29	35	8	25	
4	24	19	18	23	22	10	29	27	22	
5	19	21	14	17	19	18	31	17	40	
6	19	31	39	30	24	50	31	26	34	
7	33	23	17	26	35	24	40	29	24	
8	26	20	10	25	37	33	40	28	30	
9	16	11	23	21	20	55	44	19	34	
10	8	27	47	36	16	13	59	23	33	
	288	256	262	260	260	284	388	222	323	Somme des colonies dénombrées dans 10 champs
	A′	B′	C′	D′	E′	F′	H	J	L	
11	34	16	29	21	39	48	33	20	37	
12	17	22	32	33	30	23	31	34	56	
13	13	17	23	22	22	17	32	19	45	
14	21	23	12	20	20	28	50	20	16	
15	26	15	27	21	29	23	36	34	30	
16	18	23	33	66	38	32	22	21	21	
17	21	22	55	31	23	20	24	30	7	
18	35	14	28	12	23	24	23	12	7	
19	25	24	20	15	19	20	33	13	7	
20	62	39	27	58	27	43	20	26	33	
	267	215	286	299	270	278	304	229	259	Somme des colonies dénombrées dans 10 champs
	555	471	548	559	530	562	692	451	582	Somme des colonies dénombrées dans 20 champs
	1026		1107		1092		1143			Somme des colonies dénombrées dans 40 champs
	I		II		III		V	VII	IX	Secteurs

Valeurs comparatives de la plaque-étalon

x	n	x—m′	(x—m′)²	
7	3	— 60	(400) · 3 = 1200	m′ = 27
8	2	— 38	(361) · 2 = 722	
9	0	0	(289) · 2 = 578	m = $27 + \frac{90}{180}$
10	2	— 34	(256) · 1 = 256	
11	1	— 16	(225) · 3 = 675	
12	3	— 45	(196) · 3 = 588	m = 27,50
13	3	— 42	(169) · 2 = 338	
14	2	— 26	(144) · 3 = 432	$s^2 = \frac{22 \cdot 039}{180}$
15	3	— 36	(121) · 4 = 484	
16	4	— 44	(100) · 6 = 600	
17	6	— 60	(81) · 6 = 486	s^2 = 122,43
18	6	— 54	(64) · 7 = 448	
19	7	— 56	(49) · 10 = 490	$\sigma^2 = 122{,}43 - (0{,}5)^2$
20	10	— 70	(36) · 8 = 288	$\sigma^2 = 122{,}43 - 0{,}25$
21	8	— 48	(25) · 7 = 175	σ^2 = 122,18
22	7	— 35		
23	13	— 52	(16) · 13 = 208	$\sigma = \sqrt{122{,}18}$
24	7	— 21	(9) · 7 = 63	= 11,07
25	3	— 6	(4) · 3 = 12	
26	5	— 5	(1) · 5 = 5	$\sigma m = \frac{11{,}07}{\sqrt{180}}$
27	6	0	(0) · 0 = 0	
28	5	5	(1) · 5 = 5	
29	7	14	(4) · 7 = 28	σm = 0,82
30	6	18	(9) · 6 = 54	
31	6	24	(16) · 6 = 96	2σm = 1,64
32	4	20	(25) · 4 = 100	
33	8	48	(36) · 8 = 288	$v = \frac{11{,}07 \cdot 100}{27{,}50}$
34	6	42	(49) · 6 = 294	
35	5	40	(64) · 5 = 320	
36	1	9	(81) · 1 = 81	v = 40,25
37	3	30	(100) · 3 = 300	
38	1	11	(121) · 1 = 121	
39	3	36	(144) · 3 = 432	Médiane = 25,5
40	4	52	(169) · 4 = 676	
41	1	14	(196) · 1 = 196	Mode = 23
42	1	15	(225) · 1 = 225	
43	1	16	(256) · 1 = 256	
44	2	34	(289) · 2 = 578	
45	2	36	(324) · 2 = 648	
46	0	0	(0) · 0 = 0	
47	1	20	(400) · 1 = 400	
48	1	21	(441) · 1 = 441	

x	n	x—m′	(x—m′)²	
49	0	0	(0) · 0 = 0	
50	2	46	(529) · 2 = 1058	
51	1	24	(576) · 1 = 576	
55	2	56	(784) · 2 = 1568	
56	1	29	(841) · 1 = 841	
58	1	31	(961) · 1 = 961	
59	1	32	(1024) · 1 = 1024	
62	1	35	(1225) · 1 = 1225	
66	1	39	(1521) · 1 = 1521	
67	1	40	(1600) · 1 = 1600	
		+ 90	22 039	

Résumé

L'auteur a étudié à fond, au moyen de la numération microscopique appliquée aux plaques de Petri — en se servant des principes de statistique moderne — les possibilités étendues de cette méthode, un peu oubliée il faut le dire, lors des dénombrements des micro-organismes *vivants*.

Après une courte introduction et un non moins bref rappel historique, il rappelle également qu'autrefois la limite du comptage, donc de son utilisation pratique, était déjà comprise entre un million de colonies par Petri ordinaire et pouvait même atteindre 5 millions de germes par ml de matériel encemencé, selon *Neisser*.

L'auteur, après de multiples essais expérimentaux qui seront minutieusement exposés dans ses prochains travaux, arrive à la conclusion que l'on peut obtenir une *numération globale valable* allant jusqu'à *90 millions* de bactéries par ml — et ce, sans dilution préalable — avec une erreur ne dépassant pas 4 %, en plus ou en moins.

Bibliographie

1. *Novel E.:* Quel nombre maximum de colonies peut-on compter à l'oeil nu sur un Petri ordinaire? Ces travaux, 1949, vol. 40, p. 115.
2. *Wolfhügel:* De la multiplication des bactéries dans l'eau. Arbeit. Kaiserl. Amt., 1886, tome 1.
3. *Neisser:* La numération microscopique des plaques et son emploi particulier dans l'analyse des eaux. Zeitschr. f. Hyg., 1895, vol. 19, p. 119.
   Neisser et *Klein:* Numération des germes, dans Kraus et Uhlenhut. Handbuch der Mikrobiologischen Technik, Berlin und Wien, Urban und Scharzenberg, 1923.
4. *Novel E.:* Du rôle des dilutions préalables dans l'analyse bactériologique quantitative des denrées alimentaires. Ces travaux, 1969, vol. 60, p. 12.
5. *Hesse et Niedner:* L'estimation quantitative des bactéries contenues dans les liquides. Zeitschr. f. Hyg. 1906, vol. 33, p. 259, 1903, vol. 32, 1898, vol. 29, p. 454.

6. *Hebewerth:* La méthode microscopique de Klein et quelques-unes de ses applications. Arch. f. Hyg. 1901, vol. 39, p. 324.
7. *Heim.* Manuel de bactériologie (Lehrbuch der Bakteriologie). Stuttgart, 1922, 7. Auflage.
8. *Fermi.* Brèves considérations sur la technique bactériologique, Zbl. f. Bakt. 1892, vol. 14, p. 613.
9. *Novel E.:* De quelques principes de statistique appliqués à la numération bactérienne. Ces trav. 1968, vol. 59, p. 245.
10. *Novel E.:* Comment obtenir une bonne dispersion des germes dans la totalité du milieu? Ces trav. 1971, vol. 62, p. 41.
11. *Halverson* et *Ziegler*: Application des méthodes statistiques aux problèmes bactériologiques. J. of Bacteriology, 1932, t. 23, p. 101.
12. *Standard Methods* and Waste Water, for the examination of Water. Dernière édition *1971.* Amer. publ. Health assoc., New-York, Broadway, 1790.

Entwicklung einer gaschromatographischen Bestimmungs- und Bestätigungsmethode für Hexachlorbenzolrückstände in Fetten und Oelen

B. Zimmerli und *B. Marek*
Eidgenössisches Gesundheitsamt
Sektion Pestizidrückstände und Kontaminationen
Technische Assistenz: *H. Zimmermann*

1. Einleitung

Das Fungizid Hexachlorbenzol (HCB, C_6Cl_6) wird hauptsächlich zur Saatgutbehandlung von Getreide eingesetzt und dient der Verhütung des Stink- und Steinbrandes. In der Schweiz wurde dieses Produkt zudem seit längerer Zeit auch für die Bodenbehandlung empfohlen. Für den Getreideanbau in Höhenlagen von ca. 600—800 m ü. M. hat sich diese Art des Einsatzes von Hexachlorbenzol sehr bewährt. Durch die Translokation (17) aus dem Boden in Futterpflanzen konnten in der Kuhmilch, in den erwähnten Gegenden, beachtliche Gehalte von bis zu 5 ppm Hexachlorbenzol (pro Fett) nachgewiesen werden (1). Erst kürzlich wurde die Verwendung von Hexachlorbenzol als Bodenbehandlungsmittel durch die Schweizerischen Landwirtschaftsbehörden verboten.

In Gegenden, in denen Hexachlorbenzol nur als Saatgutbeizmittel verwendet wird, ist der Hexachlorbenzolgehalt von Milchprodukten bedeutend kleiner (1,25). Die weltweite Verbreitung dieser Substanz in Tieren (18) wie auch in Humanfett und Humanmilch (3) ist daher, nach Ansicht von Fachleuten, nicht nur auf die Verwendung von Hexachlorbenzol zur Saatgutbehandlung zurückzuführen. Hexachlorbenzol findet beispielsweise auch Verwendung als feuerhemmender Zu-