LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- W. DORNER et P. DEMONT. —
Recherches sur le procédé
Burri de numération bacté-
rienne par stries (*A suivre*). 909
- L. MUSSO et GERMAIN. —
Variations de la matière
grasse du lait de vache dans
la région d'Alger (*A suivre*). 924
- A. PENA. — Dosage colorimé-
trique des phosphates dans
le lait. 942
- B. VAN DER BURG. — La réac-
tion de Storch. 946

Bibliographie analytique :

- 1^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 953

- 2^o Brevets 997

Bulletin bibliographique :

- 1^o Brevets 999

Documents et informations :

- M. BEAU. — La situation lai-
tière 1000
- Production de la margarine au
Danemark 1003
- Une nouvelle machine à traire 1003
- Le péril du lait malpropre ... 1003
- Un nouveau périodique an-
glais 1004

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

RECHERCHES SUR LE PROCÉDÉ BURRI DE NUMÉRATION BACTÉRIENNE PAR STRIES

Par W. DORNER et P. DEMONT,

de l'Établissement fédéral d'industrie laitière et de bactériologie,
Liebefeld-Berne.

Directeur : Prof. Dr. R. BURRI.

I. INTRODUCTION.

La numération bactérienne prend ces dernières années une importance croissante. On reconnaît de plus en plus qu'elle a de nombreux avantages sur les divers essais chimiques ou enzymatiques employés jusqu'ici pour déterminer la fraîcheur et la qualité du lait. Si la numération bactérienne n'a pas pris un développement plus grand dans notre pays, c'est parce qu'un procédé simple et pratique manquait. Ce procédé a été trouvé il y a quelques années par le Prof. BURRI. Le but du présent travail est de soumettre ce procédé à une étude minutieuse. Il est nécessaire, en effet, de se rendre exactement compte des avantages et des inconvénients d'un procédé avant de le recommander à titre de critérium pour juger de la qualité

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

du lait, et avant d'en faire éventuellement une base pour payer le lait selon sa qualité. Nous donnerons successivement dans notre travail la description détaillée de la technique du procédé Burri, les indications sur la manière de calibrer l'anse de platine, les résultats comparatifs des déterminations de la teneur du lait en bactéries par le procédé des stries et par la méthode classique des plaques, les indications sur l'amplitude des variations dans les déterminations parallèles par les deux procédés, les indications sur le domaine d'application du procédé Burri et finalement nous discuterons les avantages et les inconvénients ressortissants des principaux procédés de numération bactérienne.

II. APERÇU SUR LA BIBLIOGRAPHIE DE NOTRE SUJET.

Nous ne voulons pas analyser ici en détail les deux publications de BURRI (1), étant donné que nous tracerons plus loin une description détaillée de son procédé. Il est cependant nécessaire d'en rappeler le principe dès maintenant. La base sur laquelle repose le procédé du Prof. BURRI est l'emploi d'une anse de platine retenant l'équivalent de 0 cm³ 001 de lait pour mesurer le lait à ensemercer et ensuite pour le répartir sur la surface d'un tube de gélose inclinée.

H. W. CONN (2), le premier, fait allusion à l'emploi d'anses pour mesurer le lait destiné à être mélangé à la gélose pour la numération bactérienne. Il rappelle que le Laboratoire du Service d'hygiène de la ville de New-York a employé avec succès des boucles stérilisées de métal pour mesurer 0 cm³, 01 de lait. Selon les communications verbales que M. le Dr R. S. BREED, de Geneva (N.Y.), a faites à l'un de nous, il s'agissait là de petites boucles métalliques fabriquées à d'autres fins. Ces boucles étaient plongées dans le lait à l'aide d'un petit crochet et mises dans la gélose liquéfiée pour l'ensemencer. Chaque boucle servait une fois seulement.

MILLER (3), dans un travail très intéressant, recommande vivement l'emploi d'anses de platine pour mesurer le lait à ensemercer dans de la gélose liquéfiée.

HODER et SINGER (4) recommandent également l'emploi de l'anse de platine pour ensemercer la surface de gélose coulée en boîtes de PETRI. Ils relèvent que le procédé de l'anse est beaucoup plus précis que le procédé ordinaire des dilutions au moyen de pipettes.

Tout dernièrement, RICHTER (5) a fait une étude comparative de divers procédés de numération bactérienne; il en conclut que le procédé Burri est satisfaisant comme méthode approximative d'appréciation rapide de la teneur du lait en bactéries.

Nous reprendrons en détail certaines questions traitées dans ces différents mémoires en discutant les résultats que nous avons obtenus au cours de nos recherches.

III. TECHNIQUE DU PROCÉDÉ BURRI.

a) SOINS A DONNER A L'ANSE DE PLATINE (1). — L'anse de platine employée pour ensemençer la surface de la gélose est un instrument délicat en même temps que précis, puisqu'il permet de mesurer directement et rapidement une quantité de lait de l'ordre du milligramme. Il est évident qu'un tel instrument nécessite certains soins si l'on veut lui conserver sa précision, soins qui peuvent se résumer comme suit :

1. L'anse doit être rincée soigneusement à l'eau avant d'être portée dans la flamme pour la stériliser. — Si des substances organiques y restent adhérentes, elles forment assez rapidement avec le platine un carbure qui le désagrége et le rend rugueux et cassant. Cette désagrégation modifie progressivement la surface du fil et la dimension de l'anse et par là, la quantité de lait *qui s'y attache par adhésion*. La conséquence d'une anse rugueuse est l'inexactitude des résultats.

2. L'anse ne doit pas être flambée d'une manière exagérée. — Pour la stériliser il suffit amplement de l'amener pendant un instant au rouge sombre. L'incandescence prolongée du fil de platine se traduit à la longue par un affaiblissement. La soudure en tout premier lieu en souffre.

3. L'anse ne doit pas être manipulée brusquement, afin qu'elle ne se déforme pas. Bien que l'anse soit soudée et, de ce fait, qu'elle soit beaucoup plus résistante, il importe cependant de la manier avec précautions.

4. Il faut nettoyer l'anse en la trempant de temps en temps, quelques instants, dans de l'acide nitrique sitôt après flambage. Cette opération lui rend son poli primitif et la débarrasse des sels dont elle a pu se charger.

b) MILIEU DE CULTURE A EMPLOYER. — Dans un travail que nous avons publié récemment (6), nous recommandons pour la numération bactérienne la gélose au petit lait dilué peptoné. Il va de soi que n'importe quel autre milieu à la gélose peut convenir en principe. Il importe cependant que dans tous les cas le milieu sur lequel on ensemence le lait au moyen de l'anse remplisse les conditions suivantes :

1. La gélose doit être suffisamment ferme pour que l'anse ne l'éraïlle pas facilement. Elle doit même être assez ferme pour qu'il soit presque impossible d'y enfoncer l'anse (même en cherchant à le faire exprès). Dans le cas contraire, on a des difficultés à étendre le lait à ensemençer. On arrive à obtenir de la gélose ferme en surveil-

(1) On peut se procurer des anses de platine soudées et contrôlées auprès de la maison Haag-Streit, Seilerstrasse 9, Berne.

lant tout particulièrement sa réaction lorsqu'on la chauffe à l'autoclave pendant sa préparation. La gélose mise à l'autoclave en milieu tant soit peu acide, perd beaucoup de sa faculté à former une gelée solide. Il convient donc de neutraliser soigneusement les bouillons avant d'y ajouter l'agar. Une stérilisation exagérée quant à la durée ou à température trop élevée (en dessus de 108°) est aussi nuisible.

2. La surface de la gélose doit être sèche au moment de l'ensemencement. — Ce point est important, car s'il y a de l'eau libre à sa surface, la formation des colonies se fait d'une manière irrégulière. Le lait ne peut pas être étendu aussi bien. On risque, de ce fait, de voir certaines bactéries couvrir la surface entière de la gélose, empêchant ainsi le développement des autres. Il y a aussi danger de formation de colonies secondaires. Souvent, il est impossible de compter les colonies sur la gélose mouillée et, en tout cas, les résultats obtenus ne sont pas sûrs. Il convient donc, avant d'utiliser la gélose, de la laisser sécher pendant un temps assez long. En général 10 jours seront suffisants. On peut même utiliser, dans certains cas, de la gélose de 5 jours et moins seulement. Ce sont dans la règle les mêmes facteurs qui influencent la dessiccation de la gélose et sa fermeté. Une gélose insuffisamment ferme reste longtemps mouillée. Les précautions indiquées plus haut sont donc aussi applicables pour obtenir la dessiccation rapide de la surface de la gélose. Il convient de laisser reposer la gélose inclinée dans un local sec et pas trop chaud pour que l'eau de la surface s'évapore.

c) Préparation du liquide à semer. — Lorsqu'il s'agit du lait tout frais, tel que les producteurs l'apportent 2 fois par jour au local de réception, une préparation spéciale n'est pas nécessaire, car ces laits ne contiennent pas normalement un nombre de bactéries supérieur à 100.000 par cm^3 . Lorsqu'il s'agit de laits industriels plus pollués, il est nécessaire de diluer le lait avant de procéder à l'ensemencement. A cet effet, on peut ajouter 1 cm^3 du lait à examiner à 9 cm^3 d'eau. Après avoir mélangé, on procède comme avec du lait. S'il y a lieu, on dilue encore de la même manière autant de fois que c'est nécessaire.

d) Ensemencement du milieu.

1. Flamber l'anse pour la stériliser.
2. Agiter le liquide à semer.
3. Y plonger l'anse de manière à ce qu'elle soit juste couverte et que le fil de platine qui la porte forme avec la surface du liquide un angle de 45°.
4. La retirer lentement.
5. Prendre un tube de gélose dans la main gauche, en retirer le

bouchon d'ouate en le prenant entre l'auriculaire et la paume de la main droite.

6. Avancer l'anse chargée de lait dans le tube jusqu'à 1 cm. au-dessus du centre de la surface de la gélose, y poser l'anse et sans s'arrêter, la faire glisser en ligne droite le long de la surface jusqu'à 1 cm. du fond du tube.

7. Retirer l'anse en décrivant à la surface de la gélose des zigzags serrés, pour répartir sur toute la largeur de tube la pellicule de lait qui est restée adhérente ensuite du mouvement 6.

8. Boucher à nouveau le tube et l'étiquetter.

9. Rincer d'abord l'anse dans de l'eau propre, puis seulement, après, la flamber.

On veillera, au cours des opérations 4 et 6, à ne pas toucher les parois du tube avec l'anse, afin de ne pas perdre une partie du lait qu'elle retient.

e) **Température et durée de l'incubation.** — Nous recommandons d'incuber les tubes de gélose ensemencés à 30° C. pendant 48 heures. De nombreuses expériences ont prouvé qu'à 30° C. il se développait un bien plus grand nombre de bactéries qu'à 37°. La durée de l'incubation que nous recommandons prête déjà davantage à discussion. Pour être pratique, un procédé doit être rapide. Après 24 heures d'incubation, il est possible de compter une bonne partie des colonies ; après 48 heures, le plus grand nombre s'est développé. Cependant si l'on laisse l'incubation se prolonger encore 24 ou 48 heures de plus, on trouvera souvent encore une augmentation de 10 ou 20 %. D'autre part, il arrive, lorsque la surface de la gélose porte un grand nombre de colonies, que celles-ci confluent et ne peuvent plus être comptées. Dans ces cas, on trouvera d'autant moins de colonies que l'on attendra plus longtemps pour le dénombrement.

Ces influences divergentes nous ont décidé à effectuer le dénombrement des colonies après 48 heures. Il est cependant à recommander de faire une revision des tubes ensemencés après 24 heures, afin de reconnaître à temps et de taxer ceux qui pourraient porter un trop grand nombre de colonies. De cette manière, on obtient relativement tôt un résultat, on évite en grande partie la confluence des colonies et on a, malgré cela, la grande majorité des colonies susceptibles de se développer. Pour l'incubation, les tubes doivent être placés verticalement, et pour les examiner, il ne faut jamais les coucher. Au cas contraire, l'eau, qui s'est rassemblée au fond du tube durant l'incubation, peut entraîner des colonies et disperser des microbes sur la gélose, d'où erreur en cas de prolongation de l'incubation.

f) **Dénombrement des colonies.** — Pour compter les colonies, il est préférable de les considérer à travers la gélose, le verre portant dans la règle des gouttes d'eau de condensation qui rendent la visibi-

lité mauvaise. Nous avons trouvé avantageux de compter mentalement deux colonies pour une et de multiplier finalement le résultat par deux. S'il y a un grand nombre de colonies, il peut être nécessaire de partager la surface de la gélose en un certain nombre de champs, à dénombrer ensuite successivement. A cet effet, M. le Dr W. RITTER a imaginé un accessoire très commode dont la reproduction est donnée à la fig. 1. Il se compose d'une feuille de papier épaisse ou de carton mince, de couleur foncée, dans lequel on pratique deux incisions parallèles.

PROCÉDÉ DU Dr RITTER POUR LE DÉNOMBREMENT DES COLONIES SUR GÉLOSE PENCHÉE.

Phot. Dr. W. Staub.

Pour s'en servir, on introduit le tube de gélose à travers l'ouverture, de manière à ce qu'une bande étroite seulement soit visible. On dénombre les colonies qui s'y trouvent. On fait glisser le papier de

la largeur d'une bande sur le tube, on dénombre à nouveau, et ainsi de suite jusqu'à ce que toutes les colonies aient été comptées.

IV, DÉTERMINATION DES DIMENSIONS A DONNER A L'ANSE.

Il semble au premier abord que pour calibrer une anse destinée à épandre le lait sur un milieu de culture solide, comme dans la méthode Burri, il suffit d'effectuer cette calibration par pesée. Il y a différents moyens pour cela. On peut, par exemple, déterminer par pesée combien 10 anses sèches enlèvent dans un récipient taré rempli de lait.

Un deuxième procédé consiste à peser la quantité de lait enlevée par 10 anses mouillées. A cet effet, l'anse chargée de lait est déposée sur un papier filtre qui absorbe tout le lait qui ne reste pas adhérent à l'anse. L'anse est trempée à nouveau immédiatement sans qu'elle ait le temps de sécher.

On peut aussi déterminer par pesée la quantité de lait apportée de cette manière par l'anse sur le papier-filtre. MILLER (1. c.) propose de déterminer la teneur de l'anse volumétriquement en y appliquant un tube capillaire calibré qui aspire le liquide qu'elle a retenu.

Si l'on enseme sous des conditions rigoureusement comparables, 0 cm³ 001 de lait et le contenu d'une anse qui, sèche, retient 1 mgr. de lait, on constate que les résultats ne jouent pas. Cette constatation reste lorsqu'on tient compte du poids spécifique du lait. Ce fait s'explique si l'on considère que c'est la quantité de lait qui reste dans le milieu et non la quantité prélevée avec l'anse qui est importante. Les résultats de la deuxième manière de faire, à savoir la pesée de la quantité enlevée par l'anse mouillée, correspondent déjà mieux aux résultats obtenus par l'ensemencement de la même quantité de lait mesurée à la pipette. Cependant, là aussi, il y a encore des différences qui peuvent peut-être s'expliquer en admettant par analogie que, comme l'appareil pasteuriseur de STASSANO, l'anse adsorbe les bactéries du lait et les retient assez fortement. On aurait ainsi le phénomène de l'anse retenant les bactéries, mais libérant le liquide qui les contenait.

Les différentes sources d'erreur, par adsorption, par évaporation pendant la pesée, etc., nous ont conduit à abandonner les méthodes physiques pour calibrer l'anse et à chercher la solution par voie biologique. Voici comment nous avons posé le problème : Quel doit être le diamètre intérieur d'une anse en fil de platine iridié de 0, mm. 38 d'épaisseur pour que 10 anses de lait dilué dans 1 cm³ d'eau distillée donnent sur plaques un nombre de colonies égal à celui fourni par 0 cm³ 01 du même lait ensemené et incubé sous des conditions identiques.

Ces recherches par tâtonnement ont nécessairement conduit à confectionner un certain nombre d'anses qui ont été essayées successivement jusqu'à ce que l'une d'elles réponde à la condition posée.

Cependant, il est bon d'indiquer dans le tableau I la charge, soit de lait, soit d'eau distillée, qu'enlève, lors du prélèvement, une anse de dimensions connues.

La charge de l'eau se détermine comme suit : On place sur une

TABLEAU I.
CHARGE MOYENNE EN LAIT ET EN EAU DISTILLÉE D'ANSES
DE DIFFÉRENTS DIAMÈTRES.

N° de l'anse	Diamètre inférieur de l'anse de platine (fil : diamètre 0,38 mm.)	Charge moyenne avec lait complet de mélange	Charge moyenne avec eau distillée
1	1,17 mm.	1,26 mgr.	1,12 mgr.
2	1,25 »	1,42 »	1,25 »
3	1,46 »	1,62 »	1,50 »
4	1,53 »	1,70 »	1,63 »
5	1,61 »	1,97 »	1,93 »
6	1,85 »	2,44 »	2,42 »
7	2,03 »	2,69 »	2,69 »
8	2,52 »	3,52 »	3,54 »

Pour les charges moyennes, chaque nombre représente le résultat moyen d'une cinquantaine d'opérations.

balance analytique un récipient contenant du lait bien mélangé, on établit la tare (récipient fermé) et prélève un nombre connu d'anses. Après chaque prélèvement, l'anse est lavée à l'eau distillée puis flambée. On attend toujours quelques instants que le platine soit refroidi avant de tremper à nouveau l'anse dans le lait. Le trempage s'effectue d'une façon uniforme, à savoir jusqu'à ce que la boucle soit couverte et invisible et en enfonçant l'anse dans le lait suivant un angle de 45° par rapport à la surface liquide, l'anse pénétrant suivant le plan de la boucle. On retire lentement l'anse du lait de manière à ce que l'équilibre dû à la tension superficielle s'établisse convenablement. Finalement, on compense la perte de poids (récipient fermé). Divisant ensuite le poids de lait enlevé par le nombre de prélèvements, on obtient la valeur moyenne du poids de lait enlevé par l'anse lors d'un prélèvement, soit la charge propre de l'anse pour le lait, ou pour l'eau si les opérations ont été faites sur de l'eau.

Le tableau montre qu'aux diamètres inférieurs les charges de lait et d'eau distillée sont notablement différentes et qu'au fur et à mesure de l'augmentation du diamètre ces charges tendent à s'égaliser jusqu'au diamètre 2 mm 03., puis à diverger de nouveau mais en sens inverse à des diamètres supérieurs (2 mm 52.). Cette constatation est à relever au passage, car elle a son importance, comme on le verra dans la suite, pour justifier les résultats d'essais pratiques avec des laits dilués au dixième et plus.

Calibration biologique de l'anse par tâtonnement. — On met successivement dans 5 boîtes de PÉTRI, par exemple, 1 cm³ d'une dilution au 1/100 de lait mélangé, puis dans 5 autres boîtes 1 cm³ d'eau distillée. Ces dernières étant légèrement penchées, l'eau se rassemble vers le bord le plus bas. On délaye alors 10 anses de lait dans ce cm³ d'eau en s'entourant, avant, pendant et après chaque prélèvement, des précautions indiquées plus haut à propos de la calibration pondérale. Toutes les boîtes de PÉTRI étant ensemencées, on coule dans chacune d'elles 10 cm³ de gélose d'un même lot, fondue et maintenue à 45°. Chaque boîte est alors convenablement balancée pour obtenir un mélange aussi bon que possible, puis abandonnée jusqu'à prise de la gélose. Après un temps d'incubation de 48 heures à 30°, on compte les colonies développées dans chaque boîte. On a, d'une part, un nombre de colonies fourni par l'ensemencement de 0,01 cm³ de lait, qui servira de référence, et d'autre part, un nombre de colonies fourni par l'ensemencement de 10 anses.

En comparant les nombres fournis dans les deux cas et en prenant celui fourni par le lait ensemencé à raison de 0 cm³ 01 comme égal à 100, on en tire le rapport en % du rendement de l'autre procédé, rendement qui varie avec les dimensions de l'anse, et qui ne sera égal au premier que pour une grandeur définie de l'anse, ou ce qui revient à dire que dans un seul cas la charge de l'anse représente la valeur d'ensemencement d'un mm³ de lait.

Voici un tableau des valeurs moyennes obtenues avec différentes anses, dans l'ordre des recherches.

TABLEAU II
VALEUR BIOLOGIQUE MOYENNE D'ANSES DE DIFFÉRENTS DIAMÈTRES.

N° de l'anse	Diamètre inférieur en mm.	Valeur en %.
2	1,25	85
5	1,61	114
3	1,46	96
4	1,53	103

De ces résultats, on a tiré, par interpolation, la définition de l'anse quantitative. L'anse quantitative est donc celle qui ensemence dans les conditions définies plus haut une quantité de lait fournissant un même nombre de colonies qu'un mm³ du même lait ; pour une épaisseur de 0 mm. 38 de fil de platine iridié, sa boucle ronde et fermée doit avoir 1 mm. 50 de diamètre intérieur.

Cette anse est, de par nature, adaptée au lait mélangé et entier de composition moyenne. Comment se comporte-t-elle avec les laits dilués ? C'est ce qui a été déterminé au moyen de l'anse N° 4 sur des

laits de chaudières dilués au 1/10. La moyenne du rendement fut de 96 % au lieu de 103 % pour le lait non dilué. Si on rapproche ces résultats des déterminations des charges de cette anse pour le lait et l'eau, qu'on établisse ensuite le rapport en %, on trouve qu'il est de 95,8 %. Il apert donc de ces chiffres que la diminution de rendement marche pour les laits dilués approximativement de pair avec la diminution de charge pour l'eau et cela à 3 % près : ce qui est pratiquement négligeable.

Deux questions se sont posées au cours des essais de calibration et ensuite, au cours des applications de l'anse quantitative au dénombrement des bactéries du lait selon le procédé Burri :

1^o Quelle est la quantité de bactéries qui restent adhérentes à l'anse après ensemencement d'une anse de lait dans 1 cm³ d'eau stérile ?

2^o Quelle est la quantité de bactéries qui restent adhérentes à l'anse après ensemencement d'une anse de lait sur un tube de gélose inclinée selon le procédé Burri ?

Pour répondre à la première question, on a pratiqué, après chaque dilution d'une anse de lait dans 1 cm³ d'eau stérile, un ensemencement de ce qui pouvait encore rester adhérent en essuyant les deux faces de l'anse sur de la gélose inclinée comme s'il s'agissait d'un ensemencement par la méthode Burri. Le tableau suivant montre le nombre de colonies sur plaque de PÉTRI trouvé à la suite de l'ensemencement selon 1^o, mis en regard du nombre des colonies développées par les microbes restés adhérents à l'anse et révélés par l'ensemencement des deux faces de l'anse sur gélose inclinée.

TABLEAU III
POURCENTAGE DE BACTÉRIES ADSORBÉES PAR L'ANSE APRÈS RINCAGE
DANS L'EAU DISTILLÉE.

Essais	Boîtes de Pétri	Gélose inclinée	% de bactéries restées adhérentes à l'anse
1	126 colonies	0 colonies	0 %
2	64 »	2 »	3 %
3	64 »	0 »	0 %
4	49 »	1 »	2 %
5	63 »	0 »	0 %
6	240 »	10 »	4 %
7	389 »	6 »	1,5 %
8	477 »	4 »	0,8 %
			moyenne : 1,4 %

Ces sont des résultats moyens d'ensemencements consécutifs de 10 anses.

L'examen de la deuxième question a été effectué comme suit : on pratiquait un certain nombre (en général, 10) d'ensemencements sur tubes de gélose inclinée au moyen de l'anse quantitative chargée de lait, puis après chacun des ensemencements, on délayait ce qui restait adhérent à l'anse dans 1 cm³ d'eau stérile placé en boîte de PÉTRI, dans laquelle on coulait finalement de la gélose. C'est dans le fond, l'inverse de l'opération exécutée pour répondre à la première question.

Les résultats sont donnés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU IV
POURCENTAGE DE BACTÉRIES ADHÉRENTES A L'ANSE APRÈS AVOIR
ENSEMENCÉ UN TUBE DE GÉLOSE PENCHÉ.

Essais	Gélose inclinée	Boîtes de Pétri	Nombre en % des bactéries adhérentes à l'anse
1	563 colonies	9 colonies	1,6 %
2	24 »	3 »	12,0 %
3	1.309 »	59 »	4,5 %
4	1.570 »	74 »	4,7 %
5	74 »	6 »	8,1 %
6	65 »	7 »	10,7 %
7	75 »	6 »	8,0 %
8	35 »	3 »	8,5 %
			moyenne : 7,2 %

Les résultats ci-dessus indiquent que la calibration biologique de l'anse n'est pas entièrement exacte non plus. En effet, le chiffre moyen de bactéries adhérentes à l'anse après avoir déposé son contenu dans l'eau distillée est considérablement plus faible que le pourcentage moyen des bactéries qui restent sur l'anse après avoir ensemencé un tube d'agar penché. La différence entre ces deux chiffres est de 5 % environ. C'est de cette quantité que l'anse est trop petite. Si l'on considère cependant que le procédé Burri donne régulièrement des résultats supérieurs au procédé des plaques, cette erreur paraît négligeable.

V. COMPARAISON DU PROCÉDÉ BURRI AVEC LE PROCÉDÉ CLASSIQUE DE NUMÉRATION BACTÉRIENNE AU MOYEN DES PLAQUES.

Dans le chapitre précédent, il a été démontré comment on arrivait à déterminer exactement la teneur d'une anse. A cette occasion, il était intéressant de comparer les résultats de la numération bactérienne selon le procédé classique des plaques et selon le nouveau procédé Burri.

La technique employée est simple. Le même milieu de culture a

servi à faire, d'une part, des stries avec une anse normale et, d'autre part, des plaques ensemencées de 0 cm, 001³ de lait. L'incubation a été la même pour les deux genres de culture, soit 48 heures à 30° C.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau V.

TABLEAU V
RÉSULTATS MOYENS DE NUMÉRATION BACTÉRIENNE PAR LE PROCÉDÉ BURRI
ET PAR LE PROCÉDÉ CLASSIQUE DES PLAQUES.

Essais	Teneur en bactéries		Teneur des tubes en % de la teneur des plaques	Nombre de déterminations
	plaques	tubes		
1	9,400	25,000	266 %	25
2	53,000	93,300	176 %	25
3	12,500	46,700	373 %	25
4	5,200	9,400	180 %	25
5	16,200	24,900	184 %	25
			moyenne : 235 %	

Il découle clairement du tableau V que le nombre de colonies qui se développent en culture superficielle sur gélose inclinée est de beaucoup supérieur à celui des colonies qui se forment sur plaques. Ce résultat a été confirmé régulièrement par la pratique journalière. Il faut se demander maintenant quelle est la raison pour laquelle la culture selon le procédé Burri donne toujours des résultats supérieurs à la numération sur plaques. On peut invoquer, pour expliquer ce fait, plusieurs causes, dont les trois suivantes nous paraissent déterminantes :

1. **Amélioration du milieu de culture par apport de lait à l'ensemencement.** — Il découle de la description du procédé donnée au chapitre III que, pour les stries, le lait qui a servi à ensemer la surface de la gélose y subsiste pour le moins en ses composants non diffusibles. Les bactéries amenées sur la gélose se trouvent ainsi directement mélangées à ces composants du lait. Il ne fait aucun doute que cette adjonction de caséine et de matière grasse soit pour certaines espèces microbiennes un stimulant considérable. L'un de nous (7), a du reste déjà relevé ce fait dans une publication antérieure. Nous y ajoutons maintenant une seule observation, faite à bien des reprises dans la pratique du laboratoire. Il arrive très fréquemment, lorsqu'on fait des numérations bactériennes sur des laits relativement pollués, que l'on rencontre en très grand nombre des colonies d'une espèce bactérienne dans le tube ensemencé directement avec le lait, tandis que dans le tube ensemencé avec du lait dilué au 1/10, on n'en trouve plus du tout, alors qu'on devrait en attendre peut-être 20 ou 30. Cette

observation parle franchement en faveur de l'hypothèse d'une amélioration du milieu par le lait ajouté à l'ensemencement. Ce phénomène ne se produit pas sur plaques parce que là, le lait qui sert à semer le milieu, s'y mélange intimement et n'est plus aussi facilement à la disposition des bactéries.

2. Influence favorable des conditions spéciales de la surface des milieux gélosés. — Bon nombre d'espèces microbiennes qui sont presque anaérobies, tels que les divers thermobactérium, ne se développent que très difficilement sur plaques. Il est d'autant plus surprenant que ces mêmes espèces se développent relativement bien à la surface de la gélose inclinée, même lorsqu'il n'ont pas à leur disposition les restes de lait de l'ensemencement. On a donc le phénomène suivant : Des bactéries qui ne se développent pas sur plaques, probablement ensuite d'un excès d'oxygène, se développent à la surface même de la gélose, où l'oxygène les atteint encore beaucoup plus directement. Comment faut-il expliquer ce paradoxe ? Nous ne le savons pas. L'oxygène ne semble pas entrer en ligne de compte. On pourrait peut-être admettre que les bactéries trouvent des conditions spécialement bonnes dans la fine pellicule de liquide qui doit exister à la surface de la gélose ; ou qu'ensuite de l'évaporation constante à la surface, il se produise une concentration des substances nutritives, qui, si faible soit-elle, pourrait favoriser le développement bactérien. On pourrait aussi songer à un courant de diffusion qui amène constamment de nouveaux aliments à la surface. Quoi qu'il en soit, le fait est là : il existe à la surface même de la gélose des tubes penchés des conditions plus favorables pour le développement microbien que celles des plaques.

3. Influence mécanique de l'anse, par dispersion des éléments de colonies bactériennes en étendant le liquide à la surface de la gélose. — Il faut admettre que dans le lait ou un liquide de dilution, les bactéries ne sont pas toutes isolées. Il existe au contraire, des groupes ou colonies composés d'un nombre variable d'individus. Il est possible que lorsqu'un de ces groupes se trouve pris entre la gélose et l'anse, il se désagrège au frottement et donne ainsi naissance à plusieurs colonies. Sur plaques, la désagrégation ne se produit pas de cette manière. Il se pourrait donc que le nombre plus élevé de colonies que l'on observe sur la gélose inclinée comparative-ment aux plaques soit en partie motivé par cette désagrégation mécanique des groupes bactériens par l'anse.

Nous avons fait un certain nombre d'expériences dans le but de définir exactement le rôle de cette action mécanique.

Voici comment nous avons attaqué le problème. En prenant un lait dans lequel les groupes bactériens ont été préalablement disloqués, la numération sur plaques et sur gélose inclinée doit donner le

même résultat si c'est à l'action mécanique de l'anse qu'est due l'augmentation du nombre de colonies. Si les autres facteurs mentionnés sous 1 et 2 jouent également un rôle, un tel lait présentera une différence d'autant plus grande entre le nombre de colonies qui se forment sur la gélose penchée et sur plaques, que l'influence de ces facteurs est importante. Nous avons pensé que dans du lait fraîchement homogénéisé, la condition énoncée plus haut, absence de groupes bactériens, était remplie. L'homogénéisation est, en effet, une opération qui réduit le diamètre des globules gras du lait à une fraction de millième de millimètre. L'énorme friction à laquelle le lait est soumis dans la machine à homogénéiser ne peut manquer de désagréger les groupes microbiens. Nous avons fait un certain nombre d'essais en déterminant la teneur en bactéries du lait avant et après l'homogénéisation en employant le procédé Burri et le procédé classique des plaques. Ces essais de numération ont été répétés 25 à 30 fois pour exclure les résultats accidentels. Toutes les mesures ont été prises pour éviter que le lait ne soit pollué par la machine à homogénéiser. A cet effet, la machine était remplie d'alcool à 70 % la veille et vidée le matin avant d'être utilisée. L'alcool était éliminé par un rinçage à l'eau chaude. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau VI.

Les colonnes 8 et 9 du tableau VI appellent encore quelques explications. Ces résultats ont été calculés sur la base des résultats portés à la colonne 7. En effet, si l'action mécanique de l'anse est nulle, on doit trouver théoriquement la même augmentation pourcent dans les cultures sur gélose penchée, que le lait soit homogénéisé ou non. Si par contre, il existe des différences, celles-ci proviennent de l'action désagrégeante de l'anse. Un calcul très simple donne en % quelle est la part de l'action de l'anse et quelle est celle du milieu à l'augmentation totale de la teneur en germes sur gélose penchée. Il suffit pour cela de faire l'opération suivante :

$$100 \times \frac{\text{Différence \% de la teneur bactérienne sur stries de celle sur plaques avec du lait homogénéisé.}}{\text{Différence \% de la teneur bactérienne sur stries de celle obtenue sur plaques avec du lait non homogénéisé.}}$$

Le résultat de l'opération indique la part du milieu en % de l'augmentation totale. La part de l'action mécanique de l'anse est trouvée en établissant la différence à 100.

Il découle du tableau VI, que, selon les échantillons de lait, l'action désagrégeante de l'anse et l'effet du milieu varient beaucoup. Leur part respective va selon les essais de 0 à 85 et de 14 à 100 %. Le résultat n'est pas surprenant, étant donné la variété d'espèces microbiennes que l'on trouve dans le lait et les conditions si changeantes sous lesquelles les bactéries s'y trouvent. Nos résultats ne nous permettent

TABEAU VI
COMPARAISON DE LA TENEUR EN BACTÉRIES DU LAIT FRAIS ET DU MÊME
LAIT HOMOGENÉISÉ DÉTERMINÉE SELON BURRI ET SUR PLAQUES.

N° de l'essai	Genre de lait	Teneur en bactéries en chiffres directs et en % du nombre trouvé dans le lait non homogénéisé				Surplus de colonies sur stries en % des colonies sur plaques	Augmentation par désagrégation sur stries en % de l'augmentation totale	Augmentation par suite des conditions du milieu sur stries en % de l'augmentation totale
		Plaques		Stries				
		Nombre	%	Nombre	%			
1	non homog.	9,400	100	25,000	100	166	85,6	14,4
	homog.	38,000	404	47,200	188	24		
2	non homog.	53,000	100	93,300	100	76	10,5	89,5
	homog.	123,000	232	206,900	221	78		
3	non homog.	12,500	100	46,700	100	273	51,3	48,7
	homog.	69,000	552	161,400	345	133		
4	non homog.	5,200	100	9,400	100	80	-10,5	110,5
	homog.	13,000	249	24,500	260	88,5		
5	non homog.	16,200	100	29,900	100	84	35,8	64,2
	homog.	30,500	188	47,000	157	54		
Total : 125 plaques, 150 stries.						Moyenne : 36,6		63,4

pas de faire des déclarations de portée générale, quant à l'influence des divers facteurs qui peuvent motiver le nombre de colonies plus élevé que l'on trouve régulièrement sur la gélose inclinée ensemencée selon le procédé Burri.

On pourrait peut-être faire valoir que l'action désagrégeante plus ou moins marquée de l'alse, ainsi que l'action favorisante que le milieu employé pour la numération bactérienne a sur certaines espèces microbiennes, constituent des facteurs d'insécurité pour le procédé Burri que n'offre pas le procédé des plaques. Il n'en est rien, car tous les procédés, excepté peut-être la numération microscopique directe, présentent des qualités favorisant ou empêchant le développement de certaines espèces.

(A suivre).