

## Méthode rapide de vérification du calibrage de l'ensemenceur Spiral

N Deschamps, J Richard

Station de recherches laitières, INRA, 78350 Jouy-en-Josas, France

(Reçu le 24 février 1989; accepté le 1<sup>er</sup> décembre 1989)

**Résumé** — La méthode de calibrage de l'ensemenceur Spiral basée sur le dénombrement des colonies a été comparée à une méthode par pesées de l'eau récoltée à la sortie du stylet. On a montré que cette méthode donnait des résultats comparables à la méthode par comptage des colonies, tout en étant plus rapide et plus précise.

**ensemenceur Spiral / calibrage / justesse / fidélité**

**Summary** — Rapid method for the verification of the Spiral plater calibration. The colony counting method for calibrating the spiral plater has been compared to a method based on the weighing of the water distributed by the stylus. It has been shown that the latter method gives similar results to the reference one. Moreover, it is less expensive and more precise.

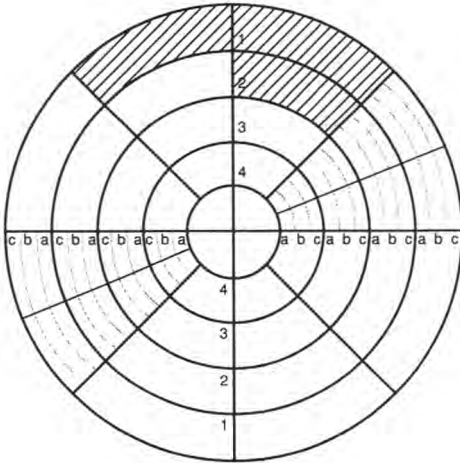
**spiral plater / calibration / accuracy / precision**

### INTRODUCTION

La méthode d'ensemencement en spirale des boîtes de Petri, proposée par Gilchrist *et al* en 1973, est maintenant considérée comme une méthode de routine de dénombrement des micro-organismes par formation de colonies (Anonyme, 1985, 1987). Divers auteurs ont montré que la justesse de cette méthode était satisfaisante (en général moins de 10% d'écart dans les nombres moyens de colonies obtenus par cette méthode et par la méthode des dilutions, prise comme référence), et que sa fidélité était comparable à cette méthode par dilutions (Gilchrist *et al*, 1973, 1977; Campbell et Gilchrist, 1973; Donnelly *et al*, 1976; Peeler *et al*, 1977; O'Connor et Fleming, 1979; Catteau *et al*, 1981; Zipkes *et al*, 1981).

La grille calibrée, proposée par le constructeur de l'ensemenceur pour faciliter le comptage des colonies (fig 1), a été également adoptée par l'APHA (American Public Health Association) et par l'AFNOR, et un protocole pour la vérification des volumes correspondant à chaque «aire» de comptage (sections de couronnes de différentes largeurs) a été décrit (Anonyme 1985, 1987). Le principe de cette vérification est simple : il suffit de dénombrer les colonies dans une aire donnée; le volume d'inoculum distribué par l'ensemenceur dans cette aire est facile à calculer, si l'on a déterminé par ailleurs la concentration cellulaire de la suspension microbienne utilisée.

Ce protocole présente néanmoins un défaut majeur : il repose sur la méthode de dénombrement microbien par formation



**Fig 1.** Grille calibrée pour le comptage des colonies sur les boîtes de Petri de 14 cm de diamètreensemencées avec l'appareil Spiral. La grille est divisée en 4 couronnes principales de même largeur et 8 secteurs égaux. Dans 2 secteurs opposés, des arcs de cercle supplémentaires définissent 12 «zones». Les parties hachurées délimitent deux «zones» différentes de comptage : 1a (à gauche) et 2a (à droite).

*Grid used for counting colonies on the surface of a 14 cm Petri dish inoculated by the Spiral plater. The counting grid is divided into 4 main rings of equal width and 8 equal sectors. Additional arcs are drawn in 2 opposite sectors to define 12 segments. Hatched areas illustrate 2 counting areas: 1a (left) and 2a (right).*

de colonies, laquelle n'est pas particulièrement fidèle. Il en résulte que les volumes d'inoculum ne sont évalués avec une bonne précision que si l'on répète plusieurs fois l'opération, ou si l'on augmente nettement le nombre de boîtes ensemencées avec chaque suspension. C'est donc un procédé relativement long et onéreux. Nous avons adopté depuis longtemps une méthode de comptage des colonies un peu différente de celle qui a été adoptée par l'APHA et par l'AFNOR; elle consiste essentiellement à faire ce dénombrement dans des aires plus larges : les couronnes

principales ou dans des zones opposés de ces couronnes (fig 1). L'avantage principal que l'on retire de ce mode de comptage, est une méthode de vérification des volumes plus simple, plus rapide et moins chère que la méthode par comptage des colonies. La description de notre méthode et la comparaison des résultats qu'elle donne à ceux de la méthode par comptage des colonies fait l'objet de la présente étude.

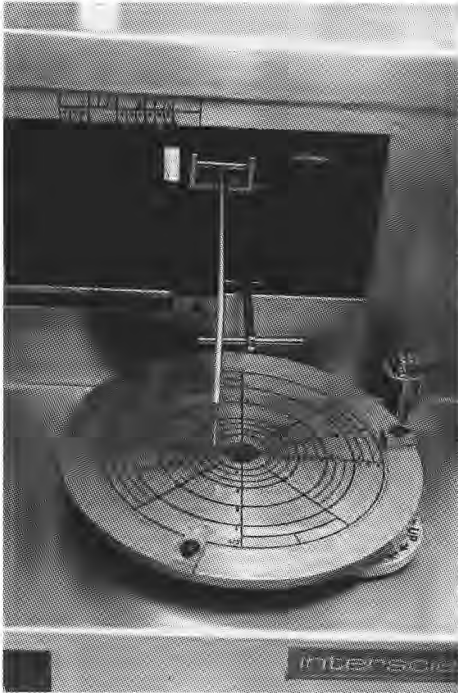
## MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'ensemble des travaux a été réalisé avec un ensemencateur Spiral System, modèle DS (Inter-science, Saint-Nom-la-Bretèche, France), adapté à l'ensemencement de boîtes de Petri de 14 cm de diamètre.

### *Etalonnage par pesées (Méthode rapide)*

Le volume délivré par l'appareil pour chacune des limites des 4 couronnes principales représentées sur la grille de comptage (fig 1) a été déterminé de la façon suivante : on a d'abord placé une photocopie exacte d'une grille de comptage sur le plateau tournant de l'appareil, en veillant bien à ce que les cercles gravés sur le plateau coïncident avec les cercles de la grille de comptage. Ensuite, on a collé sur le haut du carter de l'appareil, parallèlement au couvercle, une bande de papier découpée de part et d'autre d'un diamètre d'une seconde copie exacte de la grille de comptage (fig 2). Enfin, à l'aide d'un aimant, on a fixé, sur la partie mobile de l'appareil qui porte le stylet, une aiguille orientée perpendiculairement à la bande de papier, la pointe de cette aiguille étant placée de façon à mettre en coïncidence les limites des couronnes sur le plateau avec celles sur la bande de papier. Ainsi, on pouvait repérer, avec le maximum de précision, la position du chariot portant le stylet pour chaque limite de couronne.

L'eau sortant du stylet au cours de son déplacement a été récoltée dans un petit tube taré.



**Fig 2.** Vue de l'ensemenceur montrant la grille de comptage disposée sur le plateau, la bande de papier collée sur le carter de l'appareil et l'aiguille placée sur la partie mobile (en noir) de l'appareil portant le stylet.

*View of the Spiral plater showing the grid on the turning table, the paper strip stuck on the front of the instrument and the needle fixed on the carriage (in black) bearing the stylus.*

Durant cette récolte, la pointe du stylet restait en contact avec la paroi du tube. Quand l'aiguille approchait du repère correspondant à la limite de la couronne choisie, on arrêtait le moteur entraînant le chariot et on achevait le déplacement de ce dernier manuellement, à l'aide de la molette placée sur le côté gauche de l'appareil. On retirait le tube lorsque l'aiguille était exactement en face du repère et on le fermait immédiatement, de façon à limiter la perte d'eau par évaporation. Pour évaluer cette perte, on a laissé un tube contenant 50  $\mu$ l d'eau ouvert pendant le temps nécessaire à l'inoculation totale d'une

boîte de Petri de 14 cm (4 couronnes). On perdait ainsi, en moyenne, 0,48 mg d'eau. La perte par couronne était donc estimée à 0,12 mg.

Les pesées étaient faites à l'aide d'une balance de précision Mettler (Type B5), permettant une pesée à 0,1 mg près. On a considéré que le poids d'eau récoltée, additionné du poids d'eau perdue par évaporation, permettait une estimation du volume d'inoculum déposé par l'appareil sur la totalité ou sur une partie d'une boîte de Petri.

A chaque essai, le stylet était remis à la position de départ (premier cercle sur la fig 1). On récoltait donc successivement l'eau correspondant à la couronne n° 4, puis aux couronnes 4 et 3, puis aux couronnes 4, 3 et 2 et enfin, à la totalité. Chaque essai était répété trois fois et la moyenne des trois répétitions permettait de calculer le volume délivré par l'appareil pour chaque association de couronnes.

### **Etalonnage par comptage des colonies**

La méthode de préparation des suspensions microbiennes et d'ensemencement des boîtes de Petri décrite par l'APHA (Anonyme, 1985), a été suivie. On a d'abord utilisé une souche de *Hafnia alvei* puis une souche de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, le milieu de dénombrement étant le TSA (Tryptic Soy Agar, Difco). La culture mère était diluée dans le milieu BHI (Brain Heart Infusion, Difco). Après incubation des boîtes de Petri, on a dénombré les colonies dans des «zones» opposées, définissant ainsi une «aire» de comptage en appliquant la règle des 20 colonies, comme il est recommandé par l'APHA (arrêt du comptage dans la «zone» où la 20<sup>e</sup> colonie a été comptée. Comme cette méthode posait 2 problèmes (manque de précision des résultats, du fait d'un nombre faible de colonies comptées; absence de résultats pour certaines aires de comptage, parce que le nombre de colonies compté y était inférieur à 20) nous avons essayé les 2 variantes suivantes, pour le comptage des colonies :

— variante 1 : on a doublé la surface de comptage sur chaque boîte en effectuant ce dénombrement sur 2 zones opposées, puis sur les 2 zones opposées adjacentes. On a continué le comptage dans la ou les zones au-delà de celle où il devait s'arrêter, si l'on avait respecté la

règle des 75 colonies à ne pas dépasser dans une zone de comptage (Anonyme, 1985). Dans 9 cas sur 60, ce nombre était dépassé et dans 3 cas, on comptait plus de 100 colonies;

— variante 2 : la méthode de comptage précédente était appliquée; on utilisait en plus les résultats des aires où le nombre de colonies y était inférieur à 20.

On a effectué 3 répétitions de cette procédure de calibrage, deux avec la souche de *H. alvei* et une avec celle de *L. lactis*.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le tableau I présente les résultats d'étalement suivant la méthode par pesées. On a effectué 3 évaluations pour chaque association de couronnes et on a répété l'expérience 4 fois, à quelques jours d'intervalle. L'analyse statistique des résultats (analyse de variance hiérarchisée, Snedecor et Cochran, 1967), a révélé que les variations d'un jour à l'autre étaient significativement supérieures à celles d'une pesée à l'autre ( $P$  compris entre 0,05 et 0,01). On a évalué la variance de reproductibilité  $s^2_R$

**Tableau I.** Calibrage de l'ensemencement Spiral par pesée (moyenne de 12 déterminations : 3 essais x 4 répétitions à des dates différentes. <sup>a</sup> Intervalle de confiance calculé à partir de la variance «entre répétitions» ( $S_r + 3 S_R$ ). *Calibration of the Spiral plater by weighing (average of 12 determinations: 3 trials x 4 repetitions performed at different dates). <sup>a</sup> Confidence interval computed from the variance "between repetitions" ( $S_r + 3S_R$ ).*

Couronne n°	Ecart type		Volume ( $\mu$ l)
	Répétabilité	Reproductibilité	
4	0,21	0,07	37,1 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
4 + 3	0,15	0,28	49,9 $\pm$ 0,8
4 + 3 + 2	0,21	0,23	53,2 $\pm$ 0,7
Total	0,19	0,27	53,9 $\pm$ 0,8

à partir de la somme des carrés moyens (SCM) «entre jours» selon la formule :

$$\text{SCM «jours»} = s^2_r + 3 s^2_R$$

puisque une détermination journalière est la moyenne de 3 déterminations,  $s^2_r$  étant la variance de répétabilité.

L'écart type de répétabilité et l'écart type de reproductibilité sont du même ordre de grandeur que l'erreur engendrée par une différence de deux pesées à 0,1 mg près, soit au plus 0,2 mg. On peut donc penser qu'ils sont dus plus à une erreur de pesée qu'à une erreur de volume prélevé, résultant d'une variation dans la position de départ ou d'arrêt du stylet.

L'intervalle de confiance des volumes moyens d'inoculum, pour chaque association de couronnes, a été calculé en utilisant la somme des carrés moyens «entre jours» comme estimation de l'erreur d'une détermination. On observe qu'ils sont inférieurs à 1 mg, ce qui représente une incertitude inférieure à 1,5% sur les volumes déterminés par pesée.

Le tableau II permet de comparer les résultats d'étalement par pesée à ceux de la méthode proposée par l'APHA, avec les 3 méthodes de comptage des colonies. Pour les pesées, le volume de chaque aire a été calculé par différence de volume entre associations de couronnes (par exemple, l'aire «2a» a été obtenue en retranchant du volume total délivré par l'appareil (53,9  $\mu$ l), le volume des couronnes 3 et 4 (49,9  $\mu$ l). On a ensuite divisé cette différence (4  $\mu$ l) par 4, ce qui donne 1,00  $\mu$ l. On n'a retenu que les résultats des 3 premières répétitions, pour se placer dans des conditions analogues à celles de l'utilisation de la méthode APHA. L'intervalle de confiance des moyennes a été calculé à partir de l'écart type de distribution des 3 déterminations par répétition (différences moyennes de poids d'eau entre associations de couronnes).

**Tableau II.** Evaluation des volumes d'inoculum sur chaque aire de comptage suivant la méthode utilisée. Entre ( ): nombre de déterminations; «variante 1»: doublement des aires de comptage; «variante 2»: utilisation de tous les résultats, même si le nombre de colonies était inférieur à 20 dans une aire de comptage.

*Evaluation of the inoculum volumes in each counting area according to the method used. Between brackets: number of determinations; "Variante 1": doubling the counting areas; "Variante 2": all the results have been used even though there was less than 20 colonies in a counting area.*

Méthode	Volume			
	Aire 1a	Aire 2a	Aire 3a	Aire 4a
APHA				
Comptage normal	0,22 ± 0,12 (4)	1,18 ± 0,76 (3)	4,85 ± 4,08 (3)	18 (1)
Variante 1	0,20 ± 0,06 (6)	1,12 ± 0,32 (6)	4,72 ± 1,89 (7)	13,91 ± 1,33 (3)
Variante 2	0,21 ± 0,08 (8)	1,12 ± 0,28 (7)	4,72 ± 1,89 (7)	13,52 ± 3,02 (6)
Pesées	0,20 ± 0,12 (9)	1,00 ± 0,14 (9)	4,18 ± 0,14 (9)	13,46 ± 0,19 (9)

Avec la méthode APHA, le mode de comptage recommandé ne permettait pas d'avoir une estimation du volume correspondant à certaines aires de comptage, même en rassemblant les résultats des 3 répétitions de la méthode. Cela parce que le nombre de colonies, dans la première zone de comptage examinée, était inférieur à 20. Du fait du respect scrupuleux de la méthode de calibrage, on éliminait donc les résultats correspondant à cette dilution, quel que soit le nombre de colonies dans la zone de comptage opposée de la même boîte, ou dans les zones analogues de l'autre boîte ensemencée avec la même dilution de la suspension bactérienne. Par contre, pour certaines zones, on disposait des résultats correspondant à plusieurs dilutions successives de la suspension bactérienne. C'est la raison pour laquelle on a 4 déterminations pour l'aire 1a, mais seulement une pour l'aire 4a.

Si l'on double les aires de comptage (variante 1), on augmente nettement le nombre de déterminations des volumes,

sans que cela entraîne des variations significatives des volumes estimés, sauf pour l'aire 4a pour laquelle on trouve une valeur plus en relation avec celle déterminée par pesée. Par contre, l'incertitude sur les volumes est nettement réduite. La variante 2 de comptage (prise en compte des nombres de colonies inférieurs à 20), n'affecte pas significativement les volumes correspondant à chaque aire, ni la fidélité de ces estimations. On voit également, dans le tableau II, que les volumes d'inoculum déterminés par la méthode APHA (variante 1 de comptage de colonies) sont au plus de 12 à 13% supérieurs à ceux déterminés par pesée.

Cependant, compte tenu de l'incertitude sur chacune des estimations, aucune de ces différences n'est statistiquement significative. On notera enfin, que les déterminations par pesées sont beaucoup plus précises que par la méthode APHA, sauf pour les aires 1a et 2a, où les erreurs sont de même ordre de grandeur.



## CONCLUSION

La méthode par pesées permet une estimation plus rapide et plus précise des volumes d'inoculum déposés dans les aires de comptage des colonies que la méthode recommandée par l'APHA ou par l'AFNOR. Cette méthode est tout à fait appropriée aux boîtes de Petri de 9 ou 10 cm de diamètre. Elle est également applicable aux boîtes de 14 ou de 15 cm de diamètre. Toutefois, pour l'aire 1a, et *a fortiori* pour des aires de surface plus faible (1c et 1b), les pesées ne conviennent pas, car on est à la limite de la sensibilité des balances de précision ordinaires. Avec des balances plus sensibles, le risque est que l'erreur, due à l'évaporation de l'eau durant le prélèvement, soit importante par rapport à la masse d'eau récoltée. La méthode par comptage des colonies est mieux adaptée pour l'évaluation des volumes correspondant à ces aires.

## RÉFÉRENCES

- Anonyme (1985) *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 15th ed, American Public Health Association, New York, USA
- Anonyme (1987) *Microbiologie Alimentaire*. Ensemencement et dénombrement des microorganismes à l'aide du système «Spiral». Norme française NF V 08-100 AFNOR, Paris
- Campbell JE, Gilchrist JE (1973) Spiral plating technique for counting bacteria in milk and other foods. *Dev Ind Microbiol* 14, 95-102
- Catteau M, Auby JC, Catsaras M (1981) Système spiral et analyse bactériologique des plats cuisinés. *Recl Med Vet Ec Alfort* 157, 735-739
- Donnelly CB, Gilchrist JE, Peeler JT, Campbell JE (1976) Spiral plate count for the examination of raw and pasteurized milk. *Appl Environ Microbiol* 32, 21-27
- Gilchrist JE, Campbell JE, Donnelly CB, Peeler JT, Delaney JM (1973) Spiral plate method for bacterial determination. *Appl Microbiol* 25, 244-252
- Gilchrist JE, Donnelly CB, Peeler JT, Campbell JE (1977) Collaborative study comparing the spiral and the aerobic plate count methods. *J Assoc Off Anal Chem* 4, 807-812
- O'Connor F, Fleming MG (1979) An evaluation of the spiral count method in grading farm milk supplies. *Ir J Food Sci Technol* 3, 11-17
- Peeler JT, Gilchrist JE, Donnelly CB, Campbell JE (1977) A collaborative study of the spiral plate method for examining milk samples. *J Food Prot* 40, 462-464
- Snedecor GW, Cochran WG (1967) *Méthodes statistiques*. 6<sup>e</sup> ed, The Iowa State University Press, Ames
- Zipkes MR, Gilchrist JE, Peeler JT (1981) Comparison of yeast and mold counts by spiral, pour, and streak plate methods. *J Assoc Off Anal Chem* 44, 1465-1469