



HAL
open science

Essais du ” Coulter Counter ” pour le dénombrement de la flore totale du lait cru

M. Catoir, R. Gerber, A. Goy

► **To cite this version:**

M. Catoir, R. Gerber, A. Goy. Essais du ” Coulter Counter ” pour le dénombrement de la flore totale du lait cru. *Le Lait*, 1974, 54 (531_532), pp.22-30. <hal-00928641>

HAL Id: hal-00928641

<https://hal.science/hal-00928641v1>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

Essais du « Coulter Counter » pour le dénombrement de la flore totale du lait cru

par

M. CATOIR, R. GERBER et A. GOY
*Département Recherche et Développement
Union Laitière Vaudoise à Lausanne VD*

Pour la détermination de la flore totale du lait cru, le dénombrement sur plaques de Petri selon la méthode de Koch a été préconisé.

Dans un but de comparaison, nous avons procédé à un ensemble de travaux de nature à mettre en évidence les caractéristiques du Coulter Counter et donnons ici le résultat de nos observations.

I. — MATERIEL ET METHODE D'UTILISATION DU COMPTEUR COULTER

C'est la méthode établie par Nitsch et Paul [1] modifiée sur quelques points de détail après divers essais que nous avons finalement adoptée.

Les conditions et moyens expérimentaux sont rappelés ci-dessous.

MATERIEL ET METHODE

1.1. Milieux, réactifs, appareils

a) Milieux, gélatine spéciale Merck cat. n° 4067. Composition en g/l gélatine 150, peptone de caséine 10, extrait de levures 5, D glucose 2, pH du milieu prêt à l'emploi 7,0-7,4. Mode préparatoire : 167 g/l eau distillée. Cuire en brassant régulièrement, puis stériliser 15 mn. exactement à 121° C. La gélatine nutritive stérilisée doit être d'une couleur brun clair (ambre). Si la couleur est foncée, le pouvoir gélifiant est faible et donne des colonies amorphes.

b) Eau physiologique stérile 9 g. NaCl Merck/l eau dist.

c) 5 N HCl (729 g HCl 25 p. 100 Merck + 271 g H₂O dist.

d) Sol. de formaline 35 p. 100 Merck n° 4003.

e) Electrolyse - formaline :

NaCl	9 g
Sol. de formaline	10 ml
Eau distillée	990 ml

Filtration sur membrane (millipore GSWP 14 200 (0,22 μ)).

L'électrolyte ne doit pas avoir plus que 6-8 particules par ml pour le comptage des micro-colonies et le réglage du Coulter-Counter.

f) Tubes (contenance 30 ml, \varnothing 25 mm, haut. 75 mm, \varnothing ouverture 17 mm, papier d'aluminium comme couvercle).

g) Diluteur automatique Micro-médic système INC modèle 25 002.

h) Seringues 20 ml et 2 ml standard 50 automatique Socorex et Hauptner-Muto. pour gélatine, mélange HCl formaline et l'électrolyte.

i) Coulter-Counter type F.N.

j) Appareil mélangeur à rouleaux (brassage et mélange des micro-colonies dans le milieu + HCl-formaline + électrolyte. Les tubes sont bouchés au moyen de capsules de polyéthylène.

k) Une étude Salvis pour température de 21° C \pm 0,5° C.

1.2. Exécution

a) Nettoyer et stériliser le diluteur Micro-médic.

b) La gélatine spéciale est conservée au frigo. Avant son utilisation, elle est liquéfiée pendant 30 mn dans un bain-marie à 80° C. Tempérée 15 mn à 40° C (bain-marie) puis rapidement mise en tubes comme sous 1.2 e (environ 100 échantillons en 30 mn).

c) *Préparation des dilutions.*

Lorsque le diluteur est stérile, retourner deux fois les échantillons et aspirer 0,04 ml de lait, puis ensemercer les tubes stériles (30 ml), 0,04 ml de lait + 1 ml eau physiologique stérile, au moyen du diluteur automatique.

d) Le statif comprenant les tubes doit être bien agité afin d'obtenir un mélange homogène du lait et de l'eau physiologique. Attention de ne pas trop mouiller les parois internes des tubes (max. 1,5 cm).

e) Ajouter dans chaque tube 10 ml de gélatine spéciale stérile et tempérée en évitant les bulles d'air. Ceci au moyen de la seringue Standard 50 automatique stérilisée. Recouvrir le statif de la feuille stérile d'aluminium.

f) Plonger le statif dans l'eau froide jusqu'à solidification de la gélatine.

g) Dès que les échantillons sont solides, incuber 24 h à 21° C.

h) Comme contrôle, on remplit quelques tubes seulement avec de l'eau physiologique et de la gélatine spéciale, que l'on incube 24 h à 21° C et dans lesquels on ajoute le mélange HCl-formaline et électrolyte pour le comptage.

i) Après le temps d'incubation, on ajoute dans chaque tube 2 ml d'un mélange fraîchement préparé de 80 parties d'une solution de formaline à 35 p. 100 et de 20 parties HCl 5 N, puis les tubes sont liquéfiés dans un bain-marie à 35° C pendant 30 mn. L'acide chlorhydrique est destiné à liquéfier la gélatine, la formaline à durcir les micro-colonies.

j) Ajouter dans chaque tube 7 ml de l'électrolyte (seringuer lentement pour éviter la formation de mousse) et laisser les tubes reposer 10 mn pour que les bulles d'air puissent s'échapper.

k) Recouvrir chaque tube avec un couvercle en polyéthylène et les poser dans l'ordre numérique sur les rouleaux mélangeurs. La rotation doit être lente afin d'éviter les bulles d'air qui seraient enregistrées par l'appareil électronique. La répartition des micro-colonies doit être uniforme dans tout le tube.

l) Compter avec le Coulter Counter ; distance mesurée 0,5 ml. Capillaire : 280 μ . La valeur trouvée sur le Coulter Counter sera multipliée par 1 000 pour obtenir le nombre de micro-colonies par ml de lait.

1.3. Etalonnage de l'appareil comme décrit dans la méthode de Nitsch et Paul avec du pollen de licopodes \varnothing 25,1 μ ainsi qu'avec du lait très pollué ensemencé sur gélatine.

II. — METHODE DE REFERENCE : DENOMBREMENT SUR P.C.A.

La méthode de Koch utilisant les pipettes stériles pour le prélèvement de l'échantillon et les différentes dilutions sur milieu Plate Count Agar (Tryptone Glucose Yeast Agar) nous a servi de référence, soit :

— 0,04 ml de lait sont dilués avec H₂O physiologique dans le rapport de 1/1000 ;

— 10 ml de sol. Agar tempérée à 45° C sont mélangés avec le lait introduit auparavant dans une boîte de Petri ; le comptage se fait après une incubation de 72 h à 30° C.

L'ensemble des opérations de routine sont effectuées manuellement conformément à la pratique traditionnelle.

III. — ESSAIS ET RESULTATS

3.1. Etude de la reproductibilité des résultats

3.1.1. Nous avons considéré 29 laits de mélange prélevés dans les centres de coulage.

TABLEAU 1. — Reproductibilité des résultats

E	N° de l'échantillon		C.C.			P.C.A.		
			N	\bar{X}	C.V.	N	\bar{X}	C.V.
1	1.2.	64	5	630,6	13,4	4	628,0	21,0
		8	»	236,6	16,2	»	275,0	21,8
		34	»	1425	4,7	»	843,0	12,5
		9	—	—	—	»	—	—
		4	4	240,75	31,8	»	212,0	8,7
		31	»	915,5	10,2	»	823,0	25,5
		22	»	64,25	18	»	74,0	41,2
		18	»	60,75	40,8	»	76,0	31,2
		9	»	38,75	29,9	»	56,0	8,5
		14	»	30,25	28,7	»	37,0	18,4
2	2.2.	34	5	1132,4	15	4	559,2	11,3
		47	»	65	13,8	»	45,2	40,7
		69	»	138	22,4	»	156,2	18,0
		4	»	130,4	10,2	»	173,7	7,2
		31	»	417,8	9,9	»	292,7	23,5
		8	4	2249,7	11,5	»	821,2	56,2
		1	»	301	9,5	»	178,5	55,2
		7	»	95	25	»	114,2	21,3
		25	»	91,75	12,6	»	85,0	73,6
		54	»	147,5	2,9	»	127,5	32,8
3	27.2.	31	4	325	9,4	4	383,0	32,46
		33	»	54	12,6	»	136,2	11,04
		49	»	128,5	11,7	»	120,0	15,37
		3	»	302,2	9,9	»	267,0	34,47
		81	»	756,2	16,9	»	682,0	35,17
		4	»	142,7	8,1	»	226,0	42,12
		61	»	2218,5	24,9	»	872,0	30,61
		8	3	756,6	76,8	»	407,0	22,43
		64	4	156	17,7	»	168,0	8,03
		66	»	799,7	28,6	»	630,0	6,16

N = nombre de dilutions.

\bar{X} = moyenne des déterminations (X 1 000 germes).

C.V. = coefficient de variation en p. 100.

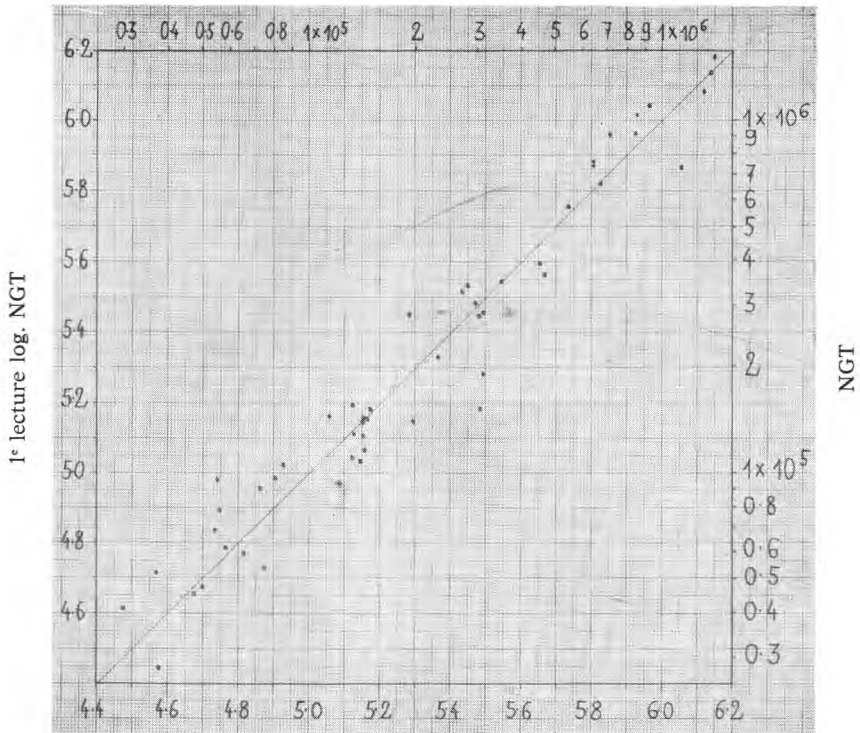


fig. 1

Graphique de reproductibilité du Coulter Counter

2° lecture du log. NGT

(NGT = nombre de germes totaux)

— Les dénombrements avec le Coulter Counter ont porté sur au moins 4 dilutions d'un même lait.

— Pour les numérations avec compteur, nous avons adopté la règle suivante, d'après la recommandation de Grappin et Jeunet [5] : Procéder à 2 déterminations successives, s'assurer qu'elles ne diffèrent pas significativement. Pratiquement, pour moins de 10 p. 100 d'écart, adopter la valeur trouvée en premier lieu, sinon procéder à une troisième détermination garantissant les conditions énoncées ci-dessus.

Cette démarche est facilement concevable dans une procédure de routine, étant donné la rapidité des lectures.

Un coefficient de variation a ainsi été calculé pour chaque lait (tab. 1).

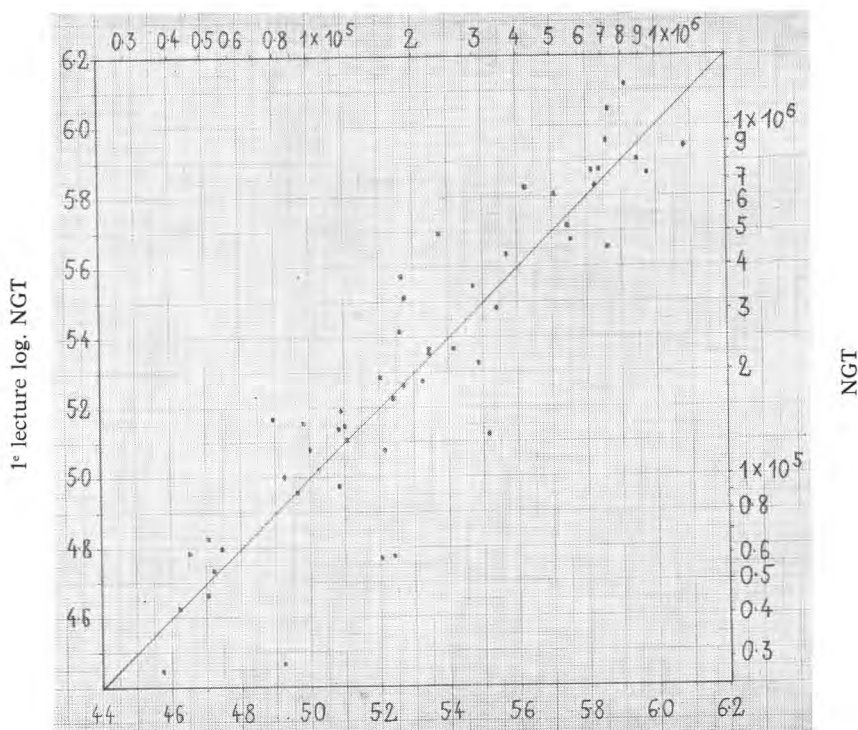


fig. 2

Graphique de reproductibilité du P.C.A.

2^e lecture log. NGT

(NGT = nombre de germes totaux)

Nous donnons en outre une représentation graphique de la reproductibilité (fig. 1).

3.1.2. Nous avons par ailleurs effectué un comptage sur plaques, 4 plaques au moins étant préparées pour chaque lait.

A nouveau, le coefficient de variation correspondant a été établi pour chaque lait (tab. 1). Une représentation graphique de la reproductibilité figure en annexe (fig. 2).

3.1.3. Pour les 29 laits, les coefficients de variation considérés par paires donnent les résultats suivants :

— pour 12 laits, soit 41,3 p. 100 des cas, le coefficient de variation et dès lors la reproductibilité est moins bonne avec le Coulter Counter qu'avec la détermination sur plaques (voir tab. 1) ;

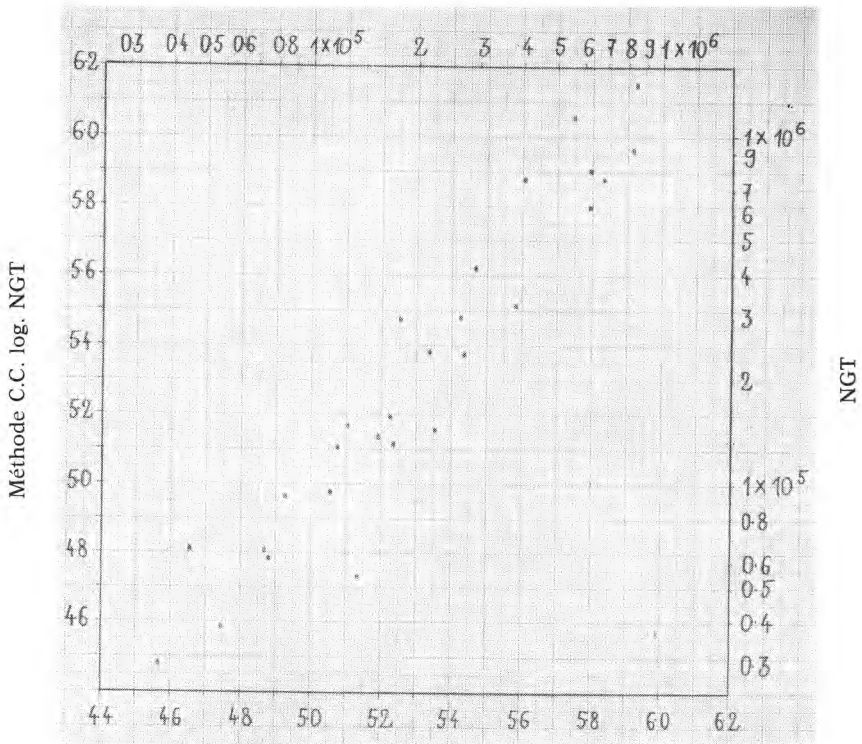


fig. 3

Graphique de corrélation entre les deux méthodes
Méthode Koch log. NGT
(NGT = nombre de germes totaux)

— pour les 17 autres laits, soit 58,7 p. 100 des cas, le coefficient de variation et dès lors la reproductibilité est meilleure avec le Coulter Counter qu'avec la numérotation sur plaques de Petri.

3.2. Etude de la corrélation

Entre les valeurs moyennes des lectures effectuées au Coulter Counter (5 dilutions par lait à 2 lectures par dilution) et au dénombrement sur plaques (5 dénombrements sur 5 plaques différentes), pour chaque lait on trouve une corrélation positive définie par un coefficient de 0,896 (voir représentation graphique fig. 3).

3.3. Incidence des modes de détermination du nombre de germes sur le paiement à la qualité

Pour une deuxième expérimentation, appliquée à 579 laits de producteurs différents, nous avons réparti les résultats obtenus respectivement par le Coulter Counter.

— la méthode de Koch,

— la réductase,

dans les trois classes du barème suisse de paiement à la qualité.

Ces classes sont définies comme suit :

1	0 —	80 000 germes
2	80 000 —	200 000 germes
3	>	200 000 germes

Les résultats de cet essai se résument comme suit :

	1 ^e catégorie	2 ^e catégorie	3 ^e catégorie
Electronique	80,5 p. 100	13,98 p. 100	5,52 p. 100
Koch	64,61 p. 100	23,48 p. 100	11,91 p. 100
Réductase (> 5 h)	97,07 p. 100 (<5 h)	2,41 p. 100 (<3 h)	0,52 p. 100

IV. — CONCLUSIONS

4.1. Ce travail permet de dégager ce qui suit :

— le comptage électronique des germes dans l'état actuel de la méthode donne des résultats pratiques au moins comparables en valeur (reproductibilité, précision) et même légèrement supérieurs à la méthode de dénombrement sur plaque de Petri (technique traditionnelle avec ensemble des opérations manuelles) ;

— une étude détaillée de la méthode de travail et assortie de perfectionnements du matériel apporterait des améliorations certaines, de nature à rendre la méthode Coulter Counter plus avantageuse encore car plus précise et plus fiable ;

— la poursuite des travaux de mise au point de la méthode Coulter Counter et de l'appareil est dès lors à considérer.

4.2. L'abaissement progressif du coût de l'analyse en fonction de la série, rend le Coulter Counter plus économique pour des dénombrements supérieurs à 250/j.

4.3. Le Coulter Counter est une formule réaliste, adaptable à court terme. A moyen terme, face à d'autres techniques également mécanisées ou automatisées, certains perfectionnements du Coulter Counter sont à envisager et d'ailleurs parfaitement réalisables.

Summary

COMPARISON OF COULTER COUNTING AND PLATE COUNTING OF BACTERIE IN RAW MILK

Our experiment based on 39 samples of raw milk shows a better reproductibility for the Coulter counts and a correlation between both methods of : 0,896.

A better and standardized procedure should be considered : it would certainly improve the reproductibility, which can't be expected from the tested plate count method.

Accordingly for the regular examination of large number of milk samples (+ 250 a day), the Electronic Coulter counting technic offers a reasonably good prospect deserving further studies and developments.

Reçu pour publication en août 1973.

Bibliographie

- [1] BRUNHILDE (Nitsch) und SIEGFRIED (Paul), Kempten (Allgäu) (1971). — Anmerkungen zur Keimzählung mit dem Coulter Counter. Interlab - Methoden - Seminar Malente. *Therma* Nr. 9.
- [2] TOLLE (A.), ZEIDLER (H.) und HEESCHEN (W.) (1966). — Ein Verfahren zur elektronischen Zählung von Milchezellen. *Milchwissenschaft*, 21, (2), 93-98.
- [3] TOLLE (A.), ZEIDLER (H.) und HEESCHEN (W.) (1968). — Die elektronische Mikrokoloniezählung - ein Verfahren zur Beurteilung der bakteriologisch-hygienischen Qualität der Rohmilch. *Milchwissenschaft*, 23, (2), 65-70.
- [4] ZEIDLER (H.), TOLLE (A.) und HEESCHEN (1968). — Verbesserte Präparationstechnik zur elektronischen Bestimmung des Zellgehaltes in Milch. *Milchwissenschaft*, 23, (9), 564-568.
- [5] GRAPPIN (R.) et JEUNET (R.) (1971). — Essais de l'appareil « Compteur Coulter » utilisé pour la détermination du nombre de cellules totales des laits de troupeaux. *Le lait*, n° 505-506, mai-juin.
- [6] PEARSON (J. K. L.), WRIGHT (C. L.) and GREER (D. O.) (oct. 1970). — A study of methods for estimating the cell content of bulk milk. *Journal of Dairy Research*, vol. 37, No 3.