



Numération automatique et rapide des bactéries du lait cru à l'aide du Bacto-Scan

R. Grappin, A. Dasen, Pascale Favennec

► To cite this version:

R. Grappin, A. Dasen, Pascale Favennec. Numération automatique et rapide des bactéries du lait cru à l'aide du Bacto-Scan. *Le Lait*, 1985, 65 (649_650), pp.123-147. hal-00929052

HAL Id: hal-00929052

<https://hal.science/hal-00929052>

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.

Numération automatique et rapide des bactéries du lait cru à l'aide du Bacto-Scan

R. GRAPPIN*, A. DASEN* et Pascale FAVENNEC**

RESUME

Le Bacto-Scan (N. Foss ApS) est un appareil effectuant à la cadence de 70 échantillons/heure un dénombrement automatique des bactéries du lait cru par microscopie épifluorescente, après traitement chimique des échantillons.

Un essai portant sur l'analyse en double exemplaire par le Bacto-Scan et par la méthode de référence (Norme FIL 100) de 234 échantillons de lait cru ayant entre 10^2 et $2,8.10^6$ UFC/ml a donné un coefficient de corrélation de 0,841 entre les deux méthodes et un écart-type résiduel de la régression référence sur Bacto-Scan de 0,296 en $\log_{10}$ après élimination des échantillons ayant moins de 30.10^3 UFC/ml. Le seuil de détection a été déterminé à 30.10^3 UFC/ml avec un intervalle de confiance à 95 % compris entre 8.10^3 et 110.10^3 UFC/ml. Le coefficient de variation de répétabilité est voisin de 5,9 %, quel que soit le niveau de concentration en bactéries.

L'analyse d'échantillons de lait traités à l'Ultra-Turrax 30 secondes à 20 000 t/min, et l'analyse d'échantillons inoculés avec des cultures pures de différentes espèces bactériennes ont montré qu'une grande partie des écarts constatés entre le Bacto-Scan et la méthode de référence provenait d'une mauvaise dispersion des amas microbiens dans le cas de la méthode de référence et d'une destruction des groupements naturels des cellules par paire ou chaîne par le Bacto-Scan.

Dans le cas d'un classement des laits en fonction des seuils 100.10^3 et 500.10^3 UFC/ml, 79,9 % des laits sont classés de façon identique par le Bacto-Scan et par la méthode de référence.

Mots clés : Lait cru - Numération des bactéries - Bacto-Scan - Microscopie épifluorescente - Précision.

* I.N.R.A., Station expérimentale Laitière - 39800 Poligny.

** Elève ingénieur, E.N.I.T.A., Dijon-Quétigny.

SUMMARY

RAPID AND AUTOMATIC ENUMERATION OF RAW MILK BACTERIA WITH THE BACTO-SCAN

The Bacto-Scan manufactured by N. Foss ApS is an instrument designed for the automatic enumeration of bacteria in raw milk by epifluorescent microscopy after chemical treatment of milk samples.

A series of 234 raw milk samples, ranging from 10^2 to $2.8 \cdot 10^6$ CFU/ml was analyzed in duplicate by the Bacto-Scan and the reference standard plate count method (IDF Standard 100). The coefficient of correlation between Bacto-Scan and SPC is 0.841 and the accuracy, expressed by the residual standard deviation from the regression of SPC on Bacto-Scan, is 0.296 in $\log_{10}$. The limit of detection is $30 \cdot 10^3$ CFU/ml, with 95 % confidence limits of $8 \cdot 10^3$ and $110 \cdot 10^3$ CFU/ml. The coefficient of variation of repeatability averages 5.9 % and is nearly constant at the various concentration levels.

Analysis of milk samples blended with an Ultra-Turrax 30 sec at 20 000 r.p.m., and the analysis of samples inoculated with pure cultures of different species of bacteria showed that the major part of the differences between Bacto-Scan and SPC stems from the poor desagregation of bacterial clumps by the reference SPC, and from disruption of the natural occurring form of bacterial cells in pair or chain, by the Bacto-Scan.

When grading milk samples according to class limits of $100 \cdot 10^3$ and $500 \cdot 10^3$ CFU/ml, 79.9 % of milk samples get an identical grade with both the Bacto-Scan and the reference SPC method.

Key words : Raw milk - Bacterial count - Bacto-Scan - Epifluorescent microscopy - Accuracy.

I. INTRODUCTION

La méthode simplifiée de dénombrement des germes totaux décrite par Thomson *et al.* (1960) est actuellement employée comme méthode officielle française pour le paiement du lait à la production en fonction de sa qualité bactériologique. Bien que la préparation des boîtes de Petri et la numération des colonies soient actuellement mécanisées (Grappin, 1975), cette technique présente pour les laboratoires interprofessionnels l'inconvénient de ne pas pouvoir être entièrement automatisée en raison de la phase d'incubation ; de plus, le délai de réponse de 3 jours est souvent considéré comme un handicap important dans le cadre d'une politique de qualité des laits.

Ces dernières années, de nouvelles méthodes rapides d'appréciation de la qualité bactériologique ont été proposées (Bossuyt, 1982 ; Kay, 1982). Parmi ces méthodes, l'appareil « Bacto-Scan » fabriqué par la Société danoise N. Foss ApS et commercialisé en France par

Foss-Electric France permet une détermination rapide et entièrement automatique du nombre total de bactéries présentes dans le lait. Après une brève description de l'appareil, nous présenterons les résultats d'une étude destinée à évaluer les principales caractéristiques analytiques du Bacto-Scan et son utilisation dans le cadre d'un paiement du lait cru en fonction de sa qualité bactériologique.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Le Bacto-Scan

Le Bacto-Scan effectue un dénombrement de bactéries colorées à l'acridine orange à l'aide d'un microscope à épifluorescence fonctionnant en continu. Pour que les bactéries puissent être comptées, il faut qu'elles soient séparées des autres éléments du lait (cellules somatiques, caséines, matière grasse) et de toutes impuretés physiques qui peuvent se trouver dans le lait. Le Bacto-Scan se compose de deux parties : une unité de préparation de l'échantillon et une unité de comptage des bactéries (fig. 1).

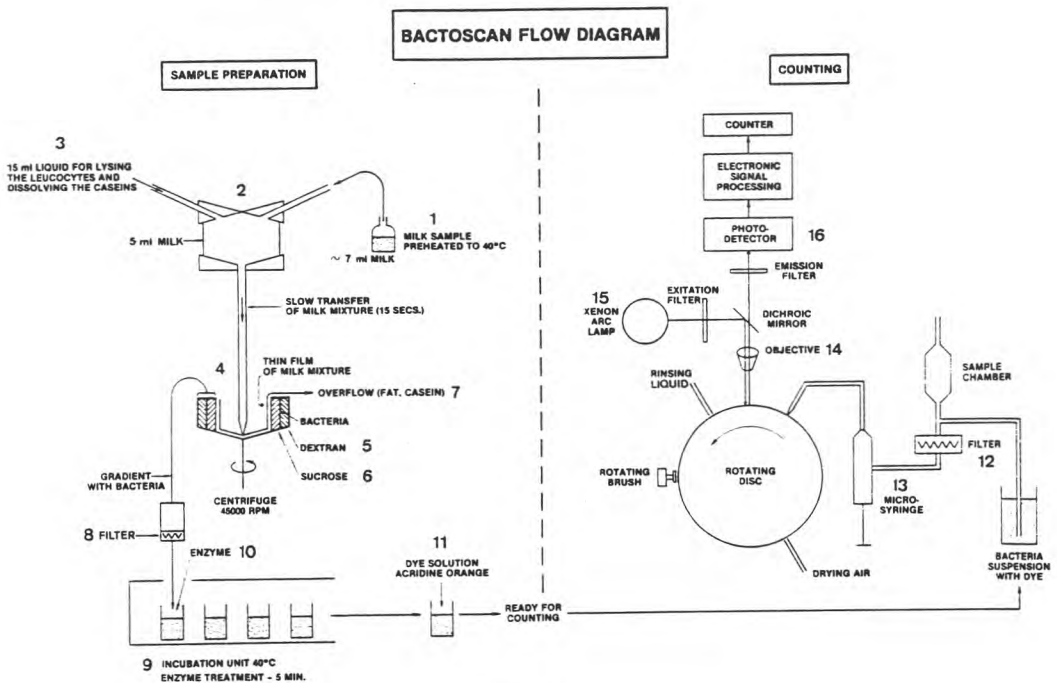


fig. 1

Schéma de l'appareil Bacto-Scan (Document N. Foss ApS).

Flow diagram of the Bacto-Scan apparatus (Courtesy of N. Foss ApS).

1. Unité de préparation

La séparation des bactéries des autres constituants du lait se fait en deux étapes : tout d'abord 5 ml de lait préchauffé à 40° C sont mélangés à 15 ml d'un liquide de lyse pour dissoudre les cellules somatiques et la caséine, ensuite une centrifugation à gradient constitué d'une solution de saccharose (1,5 ml) et de dextran (0,5 ml) permet de séparer les bactéries.

La solution de dextran de plus forte densité ($d = 1,10$) puis la solution de saccharose ($d = 1,03$) sont transférées dans le bol de la centrifugeuse tournant à une vitesse maximum de 45 000 tours/min. Les deux solutions forment deux couches superposées sur les parois verticales de la centrifugeuse jusqu'au niveau du trop-plein. Le mélange lait et produit de lyse est ensuite envoyé dans la centrifugeuse et se déplace du centre vers la périphérie en passant sur le film de saccharose. Les bactéries, de densité intermédiaire entre celles des solutions de saccharose et de dextran, traversent la couche de saccharose et sont arrêtées par le film de dextran.

La partie non retenue (matière grasse, caséine, cellules somatiques) passe au-dessus du gradient et est évacuée vers le bol de déchets. L'ensemble du processus dure 15 secondes. Le gradient renfermant les bactéries est aspiré dans le bol de l'incubateur où sont ajoutés 6 ml d'une solution d'enzymes. La suspension de bactéries est incubée pendant 5 min à une température de 40° C de façon à dissoudre d'éventuels restes de cellules ou de particules de protéines. Lorsque l'incubation est terminée, 4 ml de la solution colorante d'acridine orange sont ajoutés dans le bol de l'incubateur. L'échantillon est transféré par aspiration dans le bloc de comptage et compté immédiatement.

2. Unité de comptage automatique

La suspension bactérienne est déposée au moyen d'une seringue sous la forme d'un film de 0,5 mm de largeur et 5 microns d'épaisseur, sur la surface périphérique d'un disque tournant à la vitesse de 20 t/min sous l'objectif du microscope.

Après lecture, le disque est nettoyé par jet de deux solutions, brossé puis séché par de l'air chaud.

Le comptage, effectué en continu pendant 20 secondes, correspond à la lecture d'un volume de solution de 5 microlitres (soit l'équivalent de 2 microlitres de lait) étalé sur une bande de 2 m. Un facteur de multiplication de 500 correspondant à la dilution doit être appliqué aux lectures directes pour obtenir des résultats exprimés par millilitre de lait. La source lumineuse du microscope est une lampe à arc au Xenon. Chaque bactérie colorée passant sous l'objectif est soumise à la lumière bleue d'excitation et émet par fluorescence une certaine quantité d'énergie lumineuse de couleur rouge orangé. Le faisceau fluorescent est ensuite transformé en un signal électrique

ou impulsion par l'intermédiaire d'un photo-détecteur et enregistré par un compteur électronique. En raison du traitement chimique et physique subi par l'échantillon pendant la phase de préparation, il est admis que le comptage soit fait de façon unitaire, chaque pic lumineux correspondant à une bactérie.

Un dispositif de réglage des niveaux haut et bas de discrimination permet de ne compter que les impulsions d'une certaine dimension correspondant à l'intensité lumineuse émise par les bactéries.

3. Analyse des échantillons de lait

Au cours des essais, l'analyse des échantillons de lait a toujours été précédée d'un rinçage du système avec de l'eau saline.

Les échantillons étaient préchauffés 10 min à 40° C avant passage sur l'appareil et toutes les déterminations étaient faites en double exemplaire.

Les résultats Bacto-Scan sont exprimés en nombre d'impulsions par millilitre de lait (lecture directe $\times$ 500).

B. Analyses bactériologiques

1. Numération des germes totaux

Méthode de dénombrement des bactéries aérobies mésophiles selon la norme provisoire FIL 100 (1982), sans addition de poudre de lait dans le milieu de culture, et dénombrement des boîtes ayant entre 30 et 300 colonies. Les échantillons sont agités manuellement selon la méthode préconisée par la FIL (Norme 100).

Les résultats sont exprimés en unités formant colonies par millilitre de lait (UFC/ml).

2. Cultures pures

Afin d'étudier l'influence de l'espèce microbienne sur les mesures Bacto-Scan, différentes souches provenant de collections I.N.R.A. du Laboratoire de Microbiologie Laitière du CNRZ (Jouy-en-Josas) ont été cultivées et dénombrées dans les conditions suivantes : *P. fluorescens* CNRZ 795, *Hafnia alvei* X 12 et *E. coli* X 807, cultivées et dénombrées sur milieu PCA ; *Lb. helveticus* CNRZ 320, *St. thermophilus* CNRZ 302, *St. lactis* CNRZ 272, cultivées sur lait et dénombrées, sur milieu MRS pour *Lb. helveticus* et sur milieu M17 pour les streptocoques.

Bien que ces souches ne soient pas très représentatives de la flore naturelle du lait cru (Thomas *et al.*, 1982 ; Twomey et Crawley, 1968), elles ont été choisies sur la base de caractéristiques pouvant influencer la réponse du Bacto-Scan : coloration Gram (+ et —), morphologie (coque et bâtonnet) et taille.

C. Protocole expérimental

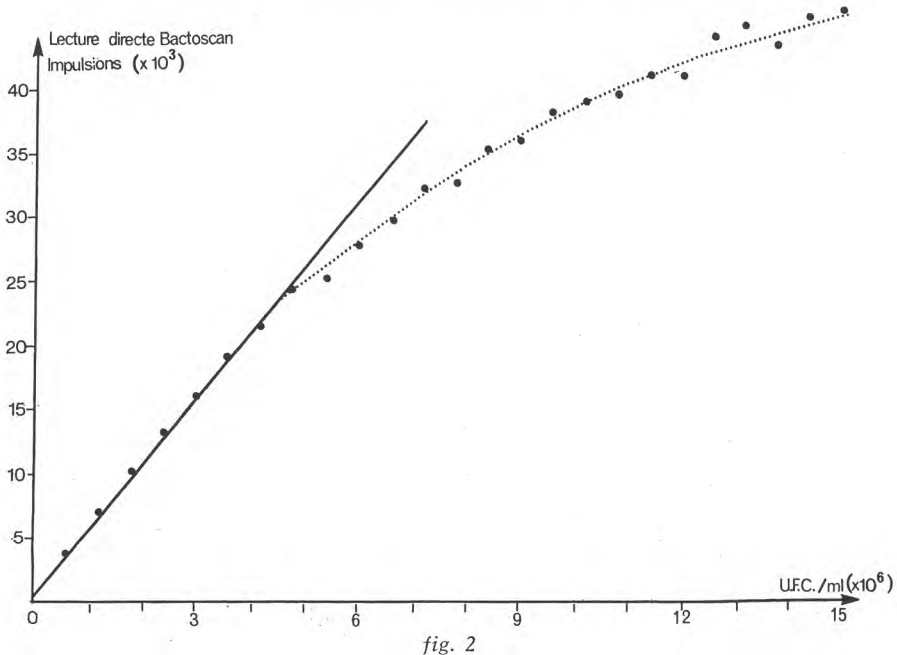
Selon le schéma préconisé par la FIL (Grappin, 1985) pour l'étude des méthodes indirectes instrumentales d'analyse du lait, une première partie sera consacrée à la vérification de deux caractéristiques instrumentales importantes de l'appareil : la linéarité de réponse et le degré de contamination d'un échantillon sur l'autre (carry-over effect) ; la deuxième partie portera sur la détermination expérimentale des caractéristiques analytiques : répétabilité, justesse et seuil de détection, et dans une troisième partie nous décrirons quelques essais destinés à expliquer les causes des écarts observés entre le Bacto-Scan et la méthode de référence. Nous donnerons enfin un exemple d'application du Bacto-Scan dans le cadre de la réglementation française actuelle du paiement du lait en fonction de la qualité bactériologique.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

A. Caractéristiques instrumentales

1. Linéarité de réponse

Le but est de déterminer les limites inférieures et supérieures de concentration à l'intérieur desquelles les réponses données par



Linéarité de réponse du Bacto-Scan (lecture directe).
Linearity of the Bacto-Scan signal (direct reading)

l'appareil sont proportionnelles au nombre de bactéries contenues dans le lait. Pour définir la limite supérieure, une série régulière de dilutions d'un lait ayant 15.10^6 bactéries/ml avec un lait contenant 10^3 bactéries a été effectuée de façon à obtenir 36 échantillons de différents teneurs en bactéries. La figure 2 montre que la réponse du Bacto-Scan est linéaire jusqu'à une concentration de $4,5.10^6$ bactéries/ml environ, au delà la courbe s'infléchit fortement. Pour la limite inférieure, l'essai mentionné au paragraphe III. C 1 et représenté sur la figure 5 montre que la réponse est linéaire au moins jusqu'au 3.10^3 UFC/ml.

Si la linéarité de réponse ne présente pas de problème pour l'analyse de laits contenant peu de bactéries, en revanche, l'appareil ne peut valablement être utilisé que pour les laits produisant moins de 25 000 impulsions en lecture directe, soit $12,5.10^6$ impulsions par ml de lait.

2. Contamination

Cette caractéristique instrumentale est estimée en analysant de l'eau et un lait chargé en germes selon la séquence suivante :

Eau (E1) - Eau (E2) - Lait (L1) - Lait (L2) - Eau (E1) - Eau (E2) - Lait (L1) - Lait (L2) etc., et en calculant le taux de contamination par la formule : $(\text{Somme E1} - \text{Somme E2}) \times 100 / \text{Somme L2}$.

Un essai portant sur l'analyse de 48 échantillons de lait en suivant le schéma défini, a montré que le taux de contamination d'un échantillon par l'échantillon qui le précède, est de 1,2 % pour le Bacto-Scan. Une valeur identique a été obtenue par Saarinen (1984) en Finlande.

Ce taux de contamination, acceptable pour un appareil automatique, peut toutefois modifier de façon sensible les résultats lorsque deux échantillons consécutifs ont des populations microbiennes très différentes. Par exemple, si dans une chaîne d'analyse, un échantillon ayant une teneur en bactéries de 3.10^6 par ml précède un échantillon ayant 80.10^3 bactéries/ml, ce dernier verra son résultat passer à $80.10^3 + 1,2 \times 3.10^6 / 100 = 116.10^3$, du fait de la contamination par l'échantillon précédent.

Afin d'améliorer la précision des mesures, une correction automatique des mesures par microprocesseur peut être envisagée.

B. Caractéristiques analytiques

Les principaux paramètres analytiques du Bacto-Scan ont été estimés à partir de l'analyse de 234 échantillons de lait ayant entre 10^2 et $2,8.10^6$ UFC/ml et comprenant 113 échantillons de lait d'une traite, 99 échantillons de lait réfrigéré de 4 traites et 22 échantillons de lait ayant été partiellement écrémé ou provenant d'un animal traité de façon aseptique afin d'obtenir des échantillons ayant très peu de bactéries.

Chaque échantillon a fait l'objet de deux déterminations par la méthode de référence et de deux déterminations par le Bacto-Scan.

1. Fidélité

a) *Répétabilité* : la répétabilité du Bacto-Scan a été déterminée à partir de l'analyse en double exemplaire de 206 échantillons de lait, les répétitions des mêmes échantillons ayant été faites à environ 10 min d'intervalle (analyses par série de 5 échantillons). Afin d'éviter une transformation logarithmique des données, les calculs ont été faits par tranches de niveau de concentration à l'intérieur desquelles les variances de répétabilité sont supposées homogènes.

Le tableau 1 résume les coefficients de variation de répétabilité (CVr), calculés par niveau, pour le Bacto-Scan et pour la méthode de référence. En dehors de la classe de lait ayant des valeurs inférieures à 38 000 UFC/ml, on observe un CVr à peu près constant quel que soit le niveau. Pour l'ensemble des échantillons le CVr moyen est de 5,9 % pour le Bacto-Scan et 11,8 % pour la méthode de référence. Cette dernière valeur est voisine de celle obtenue généralement par la méthode Thompson. Kilwein et Daun (1981) et Saarinen (1984) indiquent respectivement des CVr de 7,9 % et 5,6 % pour le Bacto-Scan.

b) *Reproductibilité sur courte période* (1 ou 2 jours) : elle a été déterminée en analysant plusieurs fois (entre 4 et 8 répétitions par jour) un même échantillon de lait conservé à 0° C pour lequel il a été vérifié par la méthode de référence qu'il n'y avait pas d'augmentation de la flore en cours de la période de conservation de 1 ou 2 jours.

Le coefficient de variation de reproductibilité moyen, calculé respectivement sur 29 et 11 essais, est de 9,0 % pour les périodes de 1 jour, et 11,7 % pour les périodes de 2 jours. Ces valeurs, qui concernent des échantillons de bonne qualité bactériologique donnant en général moins de 1 000 impulsions au Bacto-Scan (soit l'équivalent de 86 000 UFC/ml), sont supérieures à la valeur de 5,9 % obtenue pour la répétabilité (tab. 1).

2. Limites de détection (ou de détermination)

La limite de détection est définie comme étant la plus petite concentration, ici le nombre le plus faible de UFC par ml de lait, qui peut être détecté avec un certain degré de confiance (95 %) par l'appareil.

Pour les méthodes instrumentales de mesure indirecte, la limite de détection est en général déterminée par le rapport signal/bruit ; dans le cas présent, le bruit est le signal donné par l'appareil lorsque l'échantillon ne contient pas ou peu de bactéries. Si le bruit est important il masque le signal donné par les bactéries présentes.

TABLEAU 1 — TABLE 1

Répétabilité du Bacto-Scan et de la méthode de référence — *Repeatability of the Bacto-Scan and the reference method*

Niveau - <i>Level</i> impulsions/ml - <i>impulses/ml</i> (x 10 ⁴)	UFC/ml correspondant <i>Corresponding CFU/ml</i> (x 10 ³)	Nombre d'échantillons <i>Sample numbers</i>	Moyenne <i>Mean Bacto-Scan (x 10⁴)</i>	C.V. _r (%)	
				Bacto-Scan	Référence <i>Reference</i>
<25	<38	42	18	8,4	14,3
25-50	38-86	55	35	5,9	13,9
50-100	86-184	44	66	5,2	11,9
100-250	184-485	32	150	5,9	12,7
250-500	485-750	24	328	4,8	11,1
>500	>750	9	820	5,0	6,8

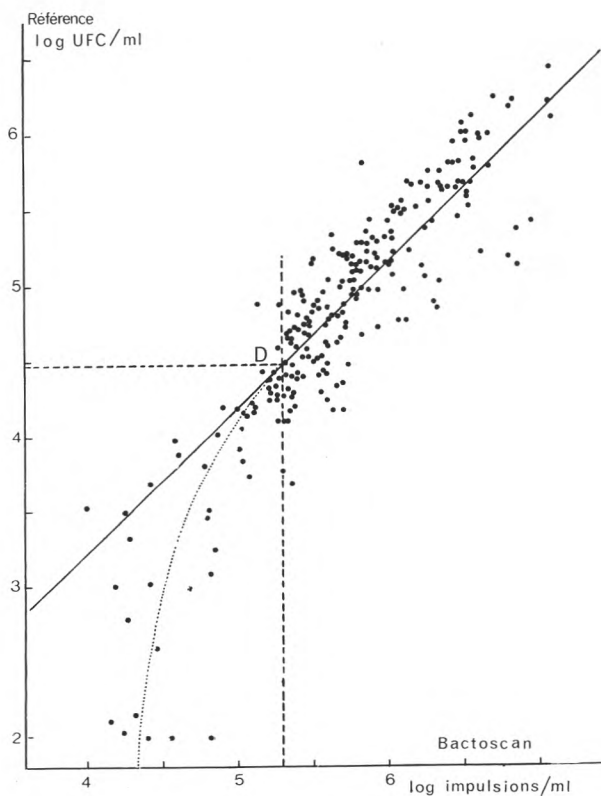


fig. 3

Diagramme de dispersion des résultats obtenus avec le Bacto-Scan et la méthode de référence.

Scatter diagram of results obtained with the Bacto-Scan and the reference method.

Pour déterminer la limite de détection on compare les résultats obtenus par le Bacto-Scan (B.S.) et par la méthode de référence (Réf.) au niveau des très faibles concentrations en bactéries.

La courbe d'ajustement (fig. 3), établie pour les 234 échantillons de lait à partir des logarithmes décimaux des moyennes arithmétiques des deux déterminations faites par chaque méthode, montre que la relation Référence-Bacto-Scan, de forme hyperbolique, n'est linéaire qu'à partir d'un certain niveau de concentration du lait en

bactéries, niveau qui correspond à la limite de détection de l'appareil. Cette limite de détection déterminée graphiquement, correspond approximativement au point D de coordonnées $\log(\text{B.S.}) = 5,3$ et $\log(\text{Réf.}) = 4,48$, soit 200×10^3 impulsions/ml pour le Bacto-Scan (correspondant à 400 impulsions en lecture directe) et 30×10^3 UFC/ml pour la méthode de référence.

En pratique, le Bacto-Scan permet d'estimer une concentration en bactéries dans le lait à partir du seuil de $30.10^3 \pm 2 s_{y, x}$ avec $s_{y, x}$ écart-type résiduel de la droite de régression des points correspondant à un signal Bacto-Scan supérieur à 5,3 (200.10^3 impulsions/ml). Il est important de souligner que sur les 47 échantillons de lait donnant un signal Bacto-Scan inférieur au seuil de détection de 200.10^3 impulsions/ml, seuls trois échantillons ont un nombre de bactéries supérieur à 30.10^3 UFC/ml. En indiquant que tout échantillon donnant une réponse Bacto-Scan inférieure à 200.10^3 impulsions/ml correspond à un lait ayant moins de 30.10^3 UFC/ml, le risque d'erreur est de l'ordre de 5 %.

3. Justesse

Après élimination des échantillons de lait donnant un résultat au Bacto-Scan inférieur à 5,3, l'équation de régression linéaire calculée sur les 187 échantillons restants ayant entre 6.10^3 et $2,8.10^6$ UFC/ml, est la suivante :

$$\log(\text{Réf.}) = \log(\text{B.S.}) \times 1,0332 - 0,999$$

avec un écart-type résiduel $s_{y, x} = 0,296$ et un coefficient de corrélation linéaire $r = 0,841$.

De ces résultats, on peut tirer les deux paramètres essentiels de la justesse : la précision d'estimation et l'exactitude de calibrage de l'appareil. Il faut souligner que la distribution des points autour de la droite présente une légère dissymétrie illustrée par l'histogramme de fréquence des résidus B.S.-Réf. déduits de la régression $\log(\text{Réf.}) = f[\log(\text{B.S.})]$. On observe qu'il y a 55 % des points donnant une réponse sous-estimée au Bacto-Scan, et un étalement plus important des points donnant une réponse surestimée au Bacto-Scan (fig. 4).

a) *Précision d'estimation* : définie comme étant l'étroitesse de l'accord entre la méthode de référence et la méthode indirecte, après élimination d'un défaut éventuel de calibrage, la précision d'estimation est donnée par les limites de l'intervalle statistique de dispersion à l'intérieur desquelles se situe, avec une probabilité de 95 %, la vraie valeur donnée par la méthode de référence. Cet intervalle est égal à $\pm t.s._{y, x}$, soit dans le cas présent : $\pm 1,96 \times 0,296 = \pm 0,580$. Le Bacto-Scan permet donc d'estimer le log du

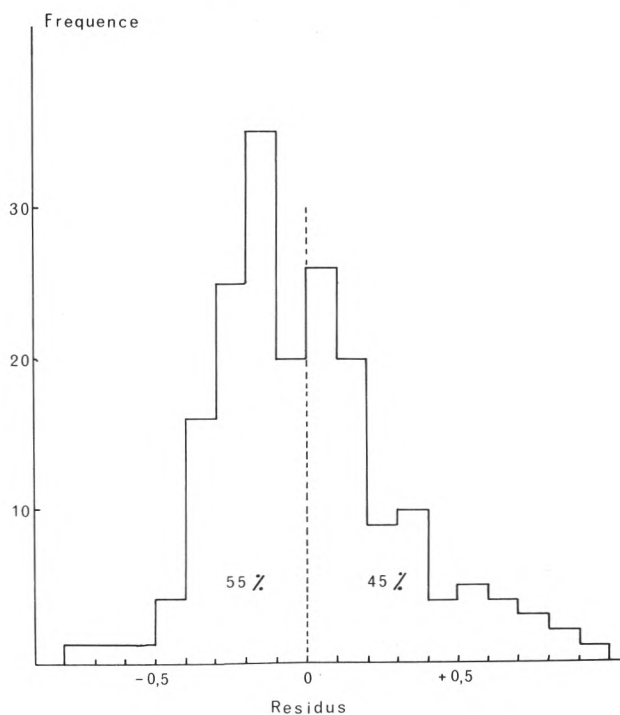


fig. 4

Histogramme des résidus de la régression : $\log \text{Réf.} = \log (\text{BS}) \times 1,0332-0,999$.

Histogram of the residuals from the regression : $\log \text{Ref.} = \log (\text{B.S.}) \times 1.0332-0.999$.

TABLEAU 2 — TABLE 2

Précision d'estimation du Bacto-Scan — Accuracy of the Bacto-Scan

Lectures Bacto-Scan <i>Bacto-Scan readings</i> (impulsions $\times 10^3/\text{ml}$) (<i>impulses $\times 10^3/\text{ml}$</i>)	Valeur estimée du nombre de UFC/ml ($\times 10^3$) <i>Estimated value of CFU/ml ($\times 10^3$)</i>	
	Moyenne <i>Mean</i>	Limites de confiance des valeurs individuelles ($P = 0,95$) <i>Confidence limits of individual values ($P = 0.95$)</i>
200	30	$8 < < 110$
645	100	$26 < < 380$
3 200	500	$130 < < 1\,900$

nombre de UFC/ml dans les limites de $\pm 0,580$ pour 95 % des échantillons. A partir de ce résultat, le tableau 2 indique, directement en nombre UFC/ml et non plus en valeur logarithmique, la précision d'estimation du Bacto-Scan pour différents niveaux de qualité bactériologique. En raison de la transformation initiale en logarithme, les limites des intervalles sont dissymétriques par rapport à la valeur moyenne, cette dissymétrie augmentant avec le niveau.

b) *Exactitude de calibrage* : pour qu'un appareil soit exactement calibré, il faut que la pente (b) de l'équation Réf. = $b \times (\text{B.S.}) + a$, ne soit pas différente de 1,000 et que l'ordonnée à l'origine (a) ne soit pas différente de zéro, cette dernière condition pouvant être remplacée par l'égalité des moyennes des deux variables.

Dans le cas présent, avec une erreur standard de b égale à $s_b = 0,049$, la pente de la droite a pour valeur : $b = 1,033 \pm 0,096$ ($P \leq 0,05$) ; elle n'est pas statistiquement différente de 1,000.

En revanche, l'hypothèse de l'égalité des deux moyennes : log Référence = 5,101 et log Bacto-Scan = 5,904 est rejetée au seuil de 1 %, l'appareil nécessite donc un calibrage.

La différence entre ces deux moyennes représente le log du facteur de multiplication (FM) des résultats Bacto-Scan par rapport aux résultats de référence.

Nous avons la relation :

$$\begin{aligned}\log(\text{FM}) &= \log(\text{B.S.}) - \log(\text{Réf.}) = 5,904 - 5,101 = 0,803 \\ \text{soit : } \log(\text{FM}) &= \log(\text{B.S./Réf.}) = 0,803 = \log 6,35 \\ \text{et FM} &= \text{B.S./Réf.} = 6,35 \text{ ou } \text{Réf.} = \text{B.S./}6,35.\end{aligned}$$

Le facteur de multiplication est de 6,35.

Compte tenu de l'existence de ce facteur de multiplication tout appareil devra être calibré, avec un coefficient peut-être différent de celui trouvé dans notre étude, afin qu'il affiche directement la concentration des échantillons de lait en UFC/ml. Dans une étude portant sur 309 échantillons de lait couvrant une très large gamme de teneur en bactéries (de $30 \cdot 10^3$ à plus de 10^7 UFC/ml), Saarinen (1984) obtient un coefficient de multiplication de 5,73. Pratiquement pour calibrer le Bacto-Scan il faudra : tout d'abord éliminer les laits produisant un signal égal ou inférieur à la valeur Bacto-Scan correspondant au seuil de détection de 30 000 UFC/ml, c'est-à-dire les échantillons donnant une lecture directe au Bacto-Scan inférieure à 400, multiplier ensuite le résultat Bacto-Scan par 500 pour tenir compte de la dilution, et enfin diviser par 6,35 qui est le facteur de multiplication de l'appareil.

Soit : concentration en UFC/ml = $(\text{B.S.}) \times 500/6,35$.

(B.S.) : lecture directe du Bacto-Scan, supérieure à 400.

500 : facteur de dilution.

6,35 : facteur de multiplication du Bacto-Scan.

C. Facteurs influençant la relation entre le Bacto-Scan et la méthode de référence

Avant d'utiliser une méthode indirecte, basée sur un principe de mesure différent de celui de la méthode de référence, il est important de rechercher l'origine des différences entre les deux méthodes observées au niveau individuel, sachant que, si la méthode indirecte est correctement calibrée, la moyenne des résultats individuels fournis par la méthode de référence doit être à chaque niveau de concentration égale à la valeur donnée par la méthode indirecte.

D'après les principes des deux méthodes Bacto-Scan et méthode de référence, basées sur la numération de signaux fluorescents émis par des cellules bactériennes ou des particules inertes colorées à l'acridine orange d'une part, et la numération de colonies bactériennes provenant de cellules isolées ou d'amas bactériens après culture sur milieu non spécifique 3 jours à 30° C d'autre part, on peut s'attendre à des différences de réponse de la part des deux méthodes en fonction non seulement de la nature de la flore présente dans le lait et de son état physiologique, mais aussi du degré de dispersion des amas microbiens au moment de la prise d'essai.

1. Influence du degré de dispersion des cellules bactériennes dans le lait

Il a été indiqué qu'en raison du traitement de l'échantillon de lait, qui comprend une fusion de la matière grasse, une dilution et une homogénéisation mécanique au cours du pipetage et de la filtration et enfin un traitement enzymatique, le Bacto-Scan doit en principe effectuer un comptage unitaire des bactéries. En revanche, dans le cas des méthodes de numération après culture sur boîte de Petri, la destruction plus ou moins importante des agrégats microbiens qui donneront naissance à un nombre plus ou moins grand de colonies va dépendre essentiellement du mode d'agitation de l'échantillon de lait avant la prise d'essai. De nombreuses études ont montré qu'en agitant fortement un échantillon de lait on peut augmenter considérablement les résultats de la méthode de référence, mais que cette augmentation est liée à la nature de la flore (Fryer, 1982). Les résultats obtenus avec la méthode Thompson augmentent en moyenne de 60 % après agitation des échantillons pendant 30 secondes à l'Ultra-Turrax (20 000 tours/min) (Richard, 1980) ; cette augmentation est nulle pour la flore thermorésistante et peut atteindre plus de 400 % pour la flore psychrotrophe résistante à la pénicilline (Piton et Richard, 1983).

Dans une expérience conduite avec 46 échantillons de lait, nous avons montré, qu'après agitation à l'Ultra-Turrax (30 secondes à 20 000 tours/min) uniquement des échantillons de lait destinés à être analysés avec la méthode de référence, la moyenne géométrique des résultats référence augmente de 156 %, passant de

270 000 à 690 000 UFC/ml, et la relation Bacto-Scan, méthode de référence est légèrement améliorée bien que statistiquement non significative, le coefficient de corrélation passant de 0,883 à 0,939 et l'écart-type résiduel en $\log_{10}$ de 0,209 à 0,164.

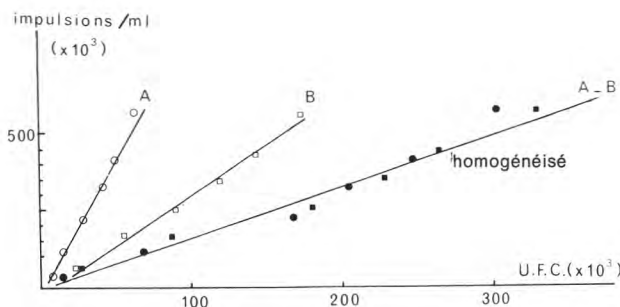


fig. 5

Droites de régression des résultats obtenus par la méthode de référence (UFC/ml) et le Bacto-Scan (impulsions/ml) pour deux séries A et B d'échantillons de lait (voir texte).

Symboles pleins (■, ●) : laits homogénéisés à l'Ultra-Turrax destinés à l'analyse par la méthode de référence.

Regression lines of results given by the reference method (CFU/ml) and Bacto-Scan (impulses/ml) for two series A and B of milk samples (see text). Fulls symbols (■, ●) : homogenized milk with the Ultra-Turrax for analysis by the reference method.

Dans une deuxième expérimentation, portant sur l'analyse d'échantillons de lait reconstitués à partir de mélanges à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80, 100 %) d'un lait pauvre en bactéries et d'un lait beaucoup plus riche (3 400 et 63 000 pour l'essai A, et 25 000 et 169 000 pour l'essai B), on constate (fig. 5) que la relation Bacto-Scan-Référence, matérialisée par les droites de régression, n'est pas la même dans les deux essais. En revanche, lorsque les analyses par la méthode de référence sont effectuées sur des laits traités à l'Ultra-Turrax, les deux droites des essais A et B deviennent confondues. Cette expérience illustre bien le rôle prédominant de la présence d'amas microbiens pour expliquer en partie les différences des résultats entre les deux méthodes.

2. Influence de la nature des bactéries

a) *Cellules isolées en chaîne* : des échantillons de lait de faible teneur en bactéries (inférieures à $50 \cdot 10^3$) ont été mélangés avec des

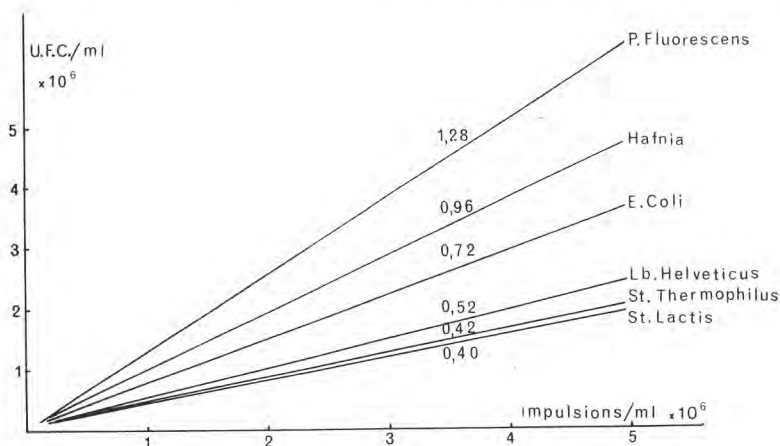


fig. 6

Relation entre les résultats obtenus par la méthode de référence (U.F.C./ml) et par le Bacto-Scan (impulsions/ml) pour différentes espèces bactériennes. Les valeurs de pente sont indiquées pour chaque droite de régression.

Relationship between (U.F.C./ml) and Bacto-Scan (impulses/ml) results, for different bacterial species. Slope values are mentioned for each regression line.

doses croissantes de cultures pures de *P. fluorescens*, *Hafnia alvei*, *E. coli*, *Lb. helveticus* et *Str. lactis* de façon à obtenir pour chaque espèce bactérienne une série de 6 échantillons de teneur croissante en bactéries. Dès les inoculations réalisées, les échantillons de lait étaient analysés avec le Bacto-Scan et par la méthode de référence sur milieux spécifiques (cf. II.B.). A souligner que les résultats donnés par la méthode de référence n'étaient pas modifiés après agitation des échantillons à l'Ultra-Turrax, indiquant l'absence d'agrégats microbiens dans les échantillons soumis à l'analyse. Cette absence d'agrégats tient au fait que les cultures ont été réalisées sur milieux liquides spécifiques et non sur lait. Les corrélations entre résultats Bacto-Scan et méthode de référence sont toujours supérieures à 0,990, et les droites de régression, portées sur la figure 6 montrent des coefficients de régression très différents suivant les espèces bactériennes. Pour tenter d'expliquer ces différences, Kaereby (1984) a émis l'hypothèse que le traitement subi par les échantillons au cours de l'analyse Bacto-Scan entraînait non seulement la désagrégation des amas bactériens mais également la rupture des groupements en chaînes des bactéries, avec comme conséquence des résultats d'autant plus élevés au Bacto-Scan, par rapport à la méthode de référence que les bactéries se présentent sous forme de cellules isolées, de paires ou de chaînes multicellulaires. Pour vérifier cette hypothèse, on peut comparer le facteur de multiplication théorique du Bacto-Scan, défini à partir des grou-

pements naturels connus des bactéries, et le facteur de multiplication expérimental déduit des pentes de la figure 6.

Le tableau 3 indique les formes de groupement sous lesquelles se présentent les différentes espèces (Bergey, 1974) et les facteurs de multiplication théoriques et expérimentaux, sachant que ce facteur sera égal à 1 pour des bactéries se présentant uniquement sous forme de cellule unique, égal à 2 pour les groupements par paires et supérieur à 2 pour les groupements en chaîne. La bonne concordance observée entre FM théoriques et FM expérimentaux pour toutes les espèces, sauf pour *P. fluorescens*, semble confirmer l'hypothèse selon laquelle le Bacto-Scan dénombre bien individuellement chaque cellule bactérienne. Pour expliquer le faible facteur de multiplication observé avec *P. fluorescens*, il faut souligner que les signaux fluorescents fournis par cette bactérie sont très faibles, à la limite du seuil de discrimination de l'appareil (fig. 7) et qu'il est vraisemblable qu'une partie des bactéries n'est pas comptée par le Bacto-Scan.

b) *Traitement thermique* : l'analyse au Bacto-Scan des cultures pures des différentes souches avant et après un traitement thermique 10 min à 100° C destiné à tuer les bactéries a donné des résultats très voisins pour les bactéries Gram +, en revanche le Bacto-Scan ne compte pas ou peu les bactéries Gram — tuées par la chaleur. Ce résultat est à rapprocher des observations faites par Hunter et Mc Corquodale (1983) dans l'étude de la méthode DEFT, qui ont montré que les bactéries Gram + (*Staph. aureus* et *St. lactis*) fixaient toujours l'acridine orange après traitement thermique.

c) *Croissance des bactéries sur milieux non spécifiques* : pour compléter la liste des causes possibles de différence entre Bacto-Scan et méthode de référence, il faut signaler que les différentes espèces bactériennes, donnant des signaux fluorescents très nets au Bacto-Scan, ne poussent pas de façon identique dans les conditions de culture utilisées par la méthode référence. On sait par exemple que *St. thermophilus* ne pousse pas ou très mal sur milieu PCA et que les streptocoques lactiques mésophiles donnent des résultats nettement inférieurs à ceux qui sont obtenus sur milieu M17 favorable à leur développement.

IV. APPLICATION : CLASSEMENT DES LAITS

Le Bacto-Scan est un appareil qui a été spécialement conçu pour être utilisé dans le cadre du paiement du lait en fonction de sa qualité bactériologique. Ce paiement s'effectue suivant une notation définie par classe de qualité : inférieure à 100 000, de 100 à 500 000 et supérieure à 500 000 UFC/ml.

TABLEAU 3 — TABLE 3

Détermination des facteurs de multiplication du Bacto-Scan pour des cultures pures de différentes espèces bactériennes (voir texte)

$$\text{Facteur de multiplication} = \frac{\text{Impulsions/ml Bacto-Scan}}{\text{UFC/ml}}$$

Determination of the Bacto-Scan multiplication factor for pure cultures of various species of bacteria (see document)

$$\text{Multiplication factor} = \frac{\text{Bacto-Scan impulses/ml}}{\text{CFU/ml}}$$

Espèces - Species	Groupement naturel Natural polymenic form	Facteur de multiplication du Bacto-Scan Multiplication factor of the Bacto-Scan	
		Attendu - Expected	Expérimental (1/pente) . Experimental (1/slope)
<i>St. lactis</i>	paire ou chaîne - pair or chain	> 2	2,5
<i>St. thermophilus</i>	paire ou chaîne - pair or chain	> 2	2,4
<i>Lb. helveticus</i>	isolée ou chaîne - single or chain	> 1,5	1,9
<i>E. coli</i>	isolée ou paire - single or pair	1,0 > 1,5	1,4
<i>Hafnia alvei</i>	indéterminée - undetermined	—	1,0
<i>P. fluorescens</i>	isolée ou paire - single or pair	1,0 > 1,5	0,8

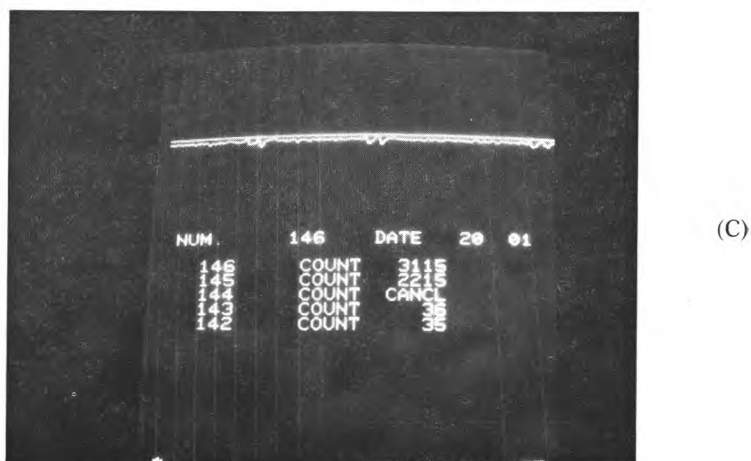
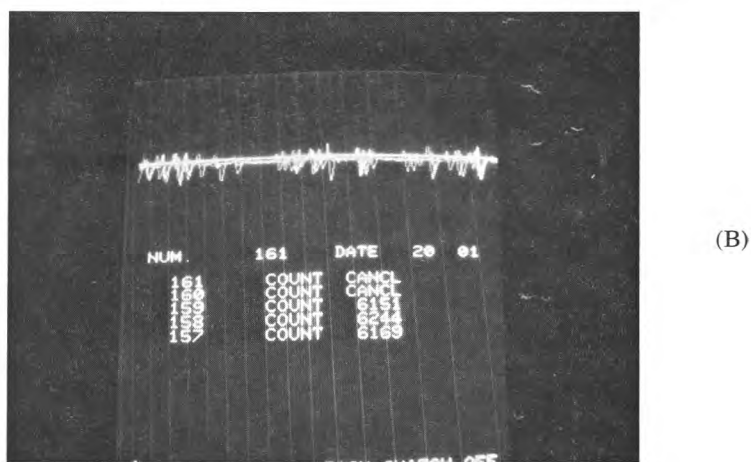
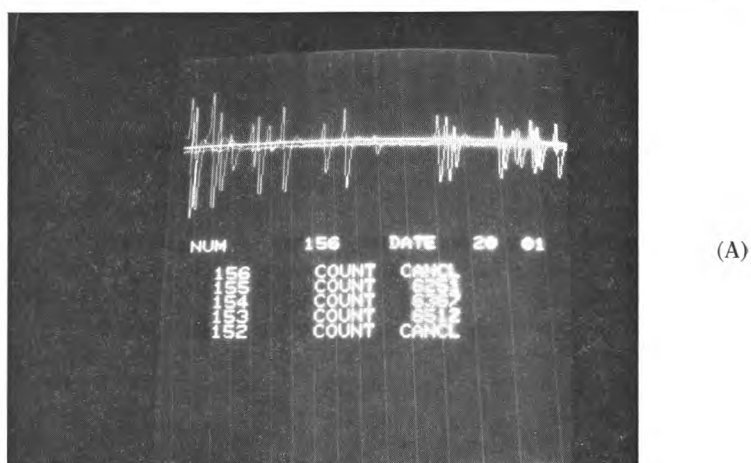


fig. 7

Images données par le Bacto-Scan des signaux fluorescents fournis par *Lb. helveticus* (A), *St. lactis* (B) et *P. fluorescens* (C).

Bacto-Scan display of fluorescent signals produced by Lb. helveticus (A), *St. lactis* (B) and *P. fluorescens* (C).

Si l'appareil est correctement calibré et si la distribution des points autour de la droite de régression est normale, la répartition du nombre d'échantillons par classe doit être identique, quelle que soit la méthode utilisée. Mais une telle comparaison n'indique pas si ce sont toujours les mêmes échantillons qui se trouvent dans une classe donnée. Pour évaluer les conséquences de l'utilisation du Bacto-Scan au niveau de chaque échantillon, il faut déterminer le nombre d'échantillons qui changent de note lorsque l'analyse est faite par le Bacto-Scan à la place de la méthode de référence.

Théoriquement, il est possible de calculer le pourcentage de laits qui seront notés de façon incorrecte. Supposons une méthode indirecte d'analyse dont la précision d'estimation est $s_{y,x}$, si nous traçons les deux droites situées à $\pm 2 s_{y,x}$ autour de la droite de régression (fig. 8), on détermine une aire à l'intérieur de laquelle se trouvent théoriquement 95 % des échantillons examinés. De plus, si on trace autour du seuil S délimitant les zones de notation 3 et 2, deux droites horizontales situées l'une à $S + 2 s_{y,x}$ et l'autre à $S - 2 s_{y,x}$, on délimite ainsi un parallélépipède à l'intérieur duquel

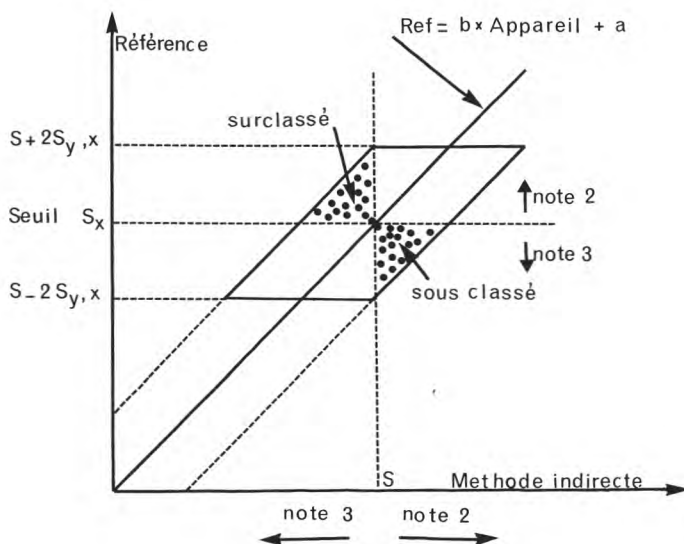


fig. 8

Régression des résultats d'une méthode référence sur ceux d'une méthode indirecte et limites de confiance approchées (95 %) des valeurs individuelles.

S : Seuil de classement des laits.

Regression of reference method on indirect method and approximate 95 % confidence belts for individual data.

S : Threshold value for milk grading.

TABLEAU 4 — TABLE 4

Comparaison des notations Bacto-Scan par rapport aux notations
données par la méthode de référence

Bacto-Scan vs. Reference grading of milk samples

Notation des laits par Bacto-Scan <i>Bacto-Scan grading of milk</i>	Nombre <i>Number</i>	Pourcentage <i>percent</i>
Notation identique <i>Identical grade</i>	187	79,9 %
Sous-classés, passant des notes : <i>Downgraded, changing from grade :</i> 3 → 2 2 → 1 3 → 1	9 8 0	3,9 3,4 12,8 %
Surclassés, passant des notes : <i>Upgraded, changing from :</i> 2 → 3 1 → 2 1 → 3	19 11 0	8,1 4,7 7,3 %

il existe un risque de donner une note fautive aux laits analysés. Les parties hachurées indiquent les points qui recevront une notation fautive (note 2 au lieu de 3, et note 3 au lieu de 2). La surface de ces deux triangles correspond à 25 % de la surface du parallélogramme. Pour un appareil ayant une précision de $\pm 2 s_{y,x'}$, 25 % au plus des laits compris entre $S \pm 2 s_{y,x}$ recevront une note fautive. Sachant que dans notre étude 126 échantillons se trouvent entre 26.10^3 et 380.10^3 UFC/ml, valeurs qui correspondent aux limites de l'intervalle de dispersion $100.10^3 \pm 2 s_{y,x}$ (cf. tab. 2), le nombre théorique d'échantillons mal classés devrait être de $126 \times 25/100 = 31$. En fait, la comparaison des notations en fonction de la méthode utilisée montre que pour le seuil de 100.10^3 UFC/ml, $19 + 9 = 28$ échantillons seraient mal classés (tab. 4). Ce résultat est très proche de la valeur théorique de 31. Le même raisonnement, appliqué au seuil de 500.10^3 donne 19 échantillons mal classés pour une valeur théorique de 22. En définitive pour l'ensemble des 234 échantillons analysés, 79,9 % sont notés de façon identique par la méthode de référence et le Bacto-Scan, 7,3 % sont sous-classés et 12,8 % sont surclassés par le Bacto-Scan.

L'inégale répartition des points autour de la droite de régression, mentionnée au paragraphe III.B.3. explique cette différence entre la proportion de laits sous-classés et celle des laits surclassés. Bien que les échantillons de lait n'aient pas été analysés par la méthode Thompson, on peut, en suivant la même démarche, estimer la proportion d'échantillons qui seraient mal classés par cette méthode. En admettant pour la méthode Thompson un écart-type de précision d'estimation de $0,18$ (Guerry, 1984), on obtient pour les seuils de 100.10^3 et 500.10^3 UFC/ml, respectivement des limites d'intervalle statistique de dispersion de 44.10^3 et 230.10^3 pour le premier seuil et 218.10^3 et $1,1.10^6$ pour le second ($P = 0,95$), à l'intérieur desquels on compte 92 et 56 échantillons. Théoriquement, 25 % des échantillons de chacune de ces deux populations soit 23 et 14 échantillons seraient notés différemment par la méthode Thompson et la méthode de référence contre 31 et 22 pour le Bacto-Scan.

V. CONCLUSION

Afin de répondre au mieux aux objectifs de l'automatisation des méthodes d'analyses (Grappin, 1980) par diminution du coût unitaire, amélioration des conditions de travail, amélioration de la fidélité des mesures et rapidité de réponse, la voie la plus souvent explorée pour automatiser les méthodes de numération des bactéries du lait a consisté à utiliser des techniques indirectes de mesure physico-chimiques, soit basées sur le dosage des produits de dégradation des éléments du lait liés à l'activité bactérienne (ammoniaque, pyruvate), ou de composés cellulaires (ATP par bioluminescence), soit en utilisant des techniques immunologiques, pour ne citer que les méthodes dites « rapides ». Mais le fait d'utiliser un principe de mesure différent de celui de la méthode de référence entraîne obligatoirement une certaine incertitude dans l'estimation des valeurs vraies représentées conventionnellement par les résultats de la méthode de référence (Grappin, 1976).

Pour limiter ces différences et répondre au mieux aux objectifs de l'automatisation, le constructeur a réalisé avec le Bacto-Scan un appareil dont le principe est le plus proche possible de celui de la méthode de référence de numération des germes aérobies mésophiles, puisque dans un cas il y a une numération directe des cellules bactériennes et dans l'autre une numération effectuée après croissance des bactéries de façon à former des colonies visibles à l'œil nu ou à la loupe. Confirmant d'autres travaux (Kilwein et Daun, 1981 ; Winterer et Grüber, 1983 ; Saarinen, 1984) nos résultats (cf. fig. 3) montrent qu'il existe au niveau des laits de troupeau une bonne corrélation entre les résultats Bacto-Scan et ceux de la méthode de référence. Soulignons qu'il faut d'une manière générale

être prudent quand on juge une méthode d'analyse par rapport à une autre méthode choisie comme référence, notamment lorsque cette dernière souffre de nombreuses imperfections, comme cela a été largement démontré pour la méthode de numération des germes totaux qui est influencée par l'agitation, le diluant, le milieu de culture et le couple temps-température d'incubation (Wilson, 1935 ; Huntanen, 1970, 1972, 1975, 1976 ; Fryer, 1982). Néanmoins, même si la méthode de référence ne donne pas obligatoirement une image exacte de la valeur vraie du nombre de bactéries présentes dans un lait il a été clairement démontré au cours des décennies passées que cette technique reflétait très bien les conditions d'hygiène dans lesquelles un lait avait été récolté et conservé avant l'analyse. Il est par conséquent extrêmement important, dans le cadre de la réglementation sur le paiement du lait, d'obtenir une corrélation suffisante entre méthode indirecte et méthode de référence, et si possible de connaître aussi les causes des différences entre les deux méthodes avant de préconiser l'utilisation de la méthode indirecte pour juger la qualité bactériologique du lait.

Il est vraisemblable que la différence du degré de dispersion des cellules bactériennes dans le lait et dans la solution de comptage du Bacto-Scan, et le faible niveau des signaux fluorescents produits par certaines espèces bactériennes représentent les sources principales des écarts entre le Bacto-Scan et la méthode de référence. En revanche, la présence de bactéries tuées pouvant être comptées par le Bacto-Scan ou la difficulté de faire croître certaines espèces sur le milieu PCA, ne doivent pas être des sources d'erreurs importantes entre les deux méthodes lorsqu'elles sont appliquées à l'analyse du lait cru.

Parmi les avantages de l'automatisation, celui de donner des méthodes d'analyse plus répétables et plus reproductibles est un atout important, en particulier lorsque ces méthodes sont utilisées dans un cadre réglementaire. Nos résultats ont montré que la répétabilité du Bacto-Scan était environ deux fois meilleure que celle de la méthode de référence, et on peut penser qu'en utilisant un système de calibrage approprié transférable à tous les appareils, il soit possible d'obtenir également une meilleure reproductibilité. Toutefois, avant qu'un tel système soit mis au point et testé, il semble que la standardisation des appareils représente encore un problème pratique important (Suhren, 1985).

Une caractéristique analytique importante des méthodes indirectes de numération des bactéries du lait concerne le seuil de détection ou de détermination qui est souvent supérieur à 100 ou 500.10^3 UFC/ml. Cette étude a montré que le Bacto-Scan avait un seuil de détection du nombre de bactéries voisin de 30.10^3 UFC/ml avec des limites de confiance à 95 % de 8.10^3 et 110.10^3 . Il faut souligner que dans notre étude une grande partie des laits ayant

moins de 30 000 UFC/ml provenaient de laits individuels ou de lait « épuré » par crémage, dont la flore n'était peut-être pas représentative de la flore normale des laits de troupeaux. Une étude portant sur un grand nombre de laits de troupeaux ayant des teneurs en bactéries comprises entre 1 000 et 50 000 UFC/ml permettrait de mieux préciser le niveau du seuil de détection du Bacto-Scan.

Afin de déterminer si le Bacto-Scan est susceptible de pouvoir être utilisé en France dans le cadre du paiement du lait en fonction de sa qualité bactériologique, il faut que la profession laitière et l'administration déterminent si les caractéristiques analytiques de l'appareil telles que nous avons pu les déterminer sont acceptables et si l'emploi de cet appareil représente, sur le plan technique et économique, un progrès par rapport aux techniques actuelles.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les Sociétés N. Foss ApS (Danemark) et Foss-Electric France pour le prêt de l'appareil et l'aide technique apportée au cours des essais.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERGEY, 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. Eighth edition. Edité par R.E. Buchanan et N.E. Gibbons.
- BOSSUYT R., 1982. Techniques modernes d'appréciation de la qualité bactériologique du lait. *Tech. Lait.*, (969), 9-19.
- FRYER T.F., 1982. Factors affecting the enumeration of micro-organisms from raw milk. *Kieler Milch. Forsch.*, 34, 96-101.
- GRAPPIN R., 1975. Mise au point sur les appareils automatiques utilisés pour la numération des germes totaux du lait : préparation des boîtes de Petri et comptage des colonies. *Rev. Lait. Fr.*, (335), 629-641.
- GRAPPIN R., 1976. Guide pour l'évaluation des méthodes d'analyses de routine. *Lait*, 56, 608-621.
- GRAPPIN R., 1980. Mécanisation et automatisation des techniques, p. 82-89. In « Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires ». Vol. 3. Le contrôle microbiologique. Edité par C.M. Bourgeois et J.Y. Leveau. Technique et Documentation, APRIA, Paris.
- GRAPPIN R., 1985. Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis. Application to calibration procedure and quality control in the dairy laboratory. In « Monograph on indirect instrumental method of milk analysis ». Publié par la Fédération Internationale de Laiterie, Bruxelles (sous presse).
- GUERRY P., 1984. Etude de trois techniques rapides d'appréciation de la qualité du lait. Mémoire I.N.A., Paris-Grignon.
- HUHTANEN C.N., BRAZIS A.R., ARLEDGE W.L., COOK E.W., DONNELLY C.B., GINN R.E., MURPHY J.N., RANDOLPH H.E., SING E.L., THOMPSON O.I., 1970. Effect of dilution bottle mixing methods on plate counts of raw milk. *J. Milk Food Technol.*, 30, 269-273.

- HUHTANEN C.N., BRAZIS A.R., ARLEDGE N.L., COOK E.W., DONNELLY C.B., GINN R.E., JEZESKI J.J., PUSCH D., RANDOLPH H.E., SING E.L., 1972. A comparison of two and three days incubation for enumerating raw milk bacteria. *J. Milk Food Technol.*, 35, 136-140.
- HUHTANEN C.N., BRAZIS A.R., ARLEDGE W.L., DONNELLY C.B., GINN R.E., RANDOLPH H.E., KOCH E.J., 1975. A comparison of phosphate buffered and distilled water dilution blanks for the standard plate count of raw milk. *J. Milk Food Technol.*, 38, 264-268.
- HUHTANEN C.N., BRAZIS A.R., ANDERSON H.J., ARLEDGE W.L., DONNELLY C.B., GINN R.E., KOCH E.J., NELSON P.E., LA GRANGE W.S., PETERSON D.E., RANDOLPH H.E., SING E.L., THOMPSON O.I., HEHR H.M., 1976. Comparison of incubation at 20 and 32° C for 48 and 72 hours for enumeration of raw milk bacteria. *J. Milk Food Technol.*, 39, 417-420.
- HUNTER A.C., Mc CORQUODALE R.M., 1983. Evaluation of the direct epifluorescent filter technique for assessing the hygienic condition of milking equipment. *J. Dairy Res.*, 50, 9-16.
- KAEREBY F., 1984. Communication personnelle.
- KAY H.W., 1982. Proceedings of the I.D.F. Symposium on bacteriological quality of raw milk. Part II. *Kieler Milch. Forsch.*, 34, 3-196.
- KILWEIN G., DAUN U., 1981. Das Bacto-Scan-Verfahren zur automatischen Bakterien zählung in der Anlieferungsmilch. *Deutsche Molk. Zeit.*, 102, 874-878.
- PITON C., RICHARD J., 1983. Influence de l'agitation des échantillons de lait cru sur les résultats de dénombrement de trois groupes microbiens d'intérêt technologique. *Lait*, 63, 405-415.
- THOMPSON D.I., DONNELLY C.B., BLACK L.A., 1960. A plate loop method for determining viable counts of raw milk. *J. Milk Food Technol.*, 23, 167-171.
- RICHARD J., 1980. Influence de l'agitation du lait cru sur les résultats de dénombrement de sa flore totale à l'aide d'une anse calibrée. *Lait*, 60, 211-235.
- SAARINEN K., 1984. The suitability of the Bacto-Scan method for grading raw milk samples. *Mejeritieleellinen Aikakauskirja*, 42, 33-43.
- SUHREN G., 1985. Communication personnelle.
- THOMAS S.B., HOBSON P.M., BIRD E.R., KING K.P., DRUCE R.G., COX D.R., 1962. The microflora of raw milk as determined by plating on yeastrel milk agar incubated at 20° C. *J. Appl. Bacteriol.*, 25, 107-115.
- TWOMEY A., CRAWLEY W.E., 1968. The microflora of raw milk. *N.Z.J. Dairy Technol.*, 3, 44-48.
- WILSON G.S., 1935. The bacteriological grading of milk : a critical study. Medical Research Council, Special Report series n° 206, 392 p., London : 4 MSO.
- WINTERER H., GRUBER V., 1983. Adaptation du procédé Bacto-Scan de dénombrement des germes totaux du lait cru. *Oster. Milch.*, 58, 373-384.
-