Mais cette analogie n'apparaîtrait pas si les cendres étaient effectuées par une méthode inexacte ou à plus forte raison par des méthodes différentes.

* * *

§ 3

CONCLUSIONS

Les conclusions qui se dégagent de l'étude de la fabrication des caséines lactiques par fermentation spontanée, *en ce qui concerne uniquement leur teneur en matières minérales*, sont les suivantes: le minimum de cendres sera obtenu *par une fermentation entièrement conduite à froid* jusqu'à un taux d'acidité devant toujours dépasser 65-70° D.

La cuisson peut être faite à n'importe quelle température, mais il est avantageux pour l'efficacité du lavage de la conduire à la température la plus basse, compatible avec le souci de ne pas perdre la matière par émiettement.

Les conditions de température de fermentation et d'acidité finale étant respectées, la diminution du taux des cendres sera uniquement fonction de la perfection des lavages. Ceux-ci, pour être très efficaces, devraient être séparés par des pressages et effectués avec l'eau aussi pure que possible.

UNE NOUVELLE MÉTHODE DE NUMÉRATION DIRECTE DES MICROBES DU LAIT (1)

(Méthode de Dreyer-Koroleff)

par

W. M. BOGDANOFF

Docent en Bactériologie, Institut de Laiterie à Wologda (Russie du Nord).

Les méthodes de numération de la microflore — celle des plaques et celle dite « de numération directe » — qui existent aujourd'hui, possèdent des avantages et des inconvénients.

La première ne peut être remplacée quand la préparation doit contenir des cellules vivantes et des cellules mortes. Cependant la

(1) Ce travail constitue véritablement une citation rétrospective du travail du défunt professeur S. A. KOROLEFF, de l'Institut de Laiterie à Wologda: « Nouvelle méthode de numération directe des cellules dans le plan total du comptage microbiologique ».

La méthode décrite a trouvé une large application dans la pratique des travaux des Instituts scientifiques expérimentaux de l'U. R. S. S.

Nous espérons, par la publication de cet article, obtenir une critique de la méthode préconisée.

précision de cette méthode est limitée dans plusieurs cas : elle est faible quand il s'agit de microorganismes se développant mal dans les milieux nutritifs ordinaires. De plus, la durée de l'analyse et le matériel exigé gênent fort le travail pratique en même temps que la recherche expérimentale.

La méthode de numération directe possède, sous ce rapport, de grands avantages. Il est vrai que le procédé ne distingue pas les cellules vivantes des cellules mortes. Mais quand il s'agit de lait cru dont l'acidification a été faible, cette distinction a peu d'importance, ayant affaire, dans ce cas, presque exclusivement à des éléments vivants. Ainsi l'avantage de la méthode des plaques cesse d'être essentiel et la principale objection faite à la méthode de la numération directe peut être écartée. La non-extension de l'application de cette méthode peut s'expliquer par sa technique insuffisamment au point — ce qui la rendait peu précise et assez difficilement accessible. Actuellement de nombreux procédés ont tenté de résoudre ces difficultés. Notons, avant tout, l'exploitation des appareils de THOMAS-ZEISS, TURQUE, et d'autres auteurs, qui peuvent être utilisés pour la numération des cellules des levains.

La plupart des variantes de la méthode de numération directe des bactéries comprennent l'examen, au microscope, d'une préparation séchée, fixée et colorée — d'une trace de matière, préparée par l'étalement d'un volume déterminé du liquide à examiner. Parmi ces variantes, la plus répandue est la méthode de BREED mise au point par lui en collaboration avec BROW, DOTTERER et autres collaborateurs.

La méthode de BREED diffère peu, au fond, de celles qui existaient auparavant, si l'on excepte quelques modifications dans le mode de mesurage du liquide, de la limitation de l'étalement, dans la technique même de la numération grâce à la régularisation de la grandeur du champ microscopique.

La confrontation des résultats de cette méthode avec ceux de la méthode des plaques a montré à peu près une égale précision ; mais la rapidité d'obtention des résultats donne des avantages certains à la méthode de numération directe.

Cependant, malgré ses mérites, la méthode de BREED présente de grandes difficultés techniques, qui se réduisent, dans l'essentiel, à ce qui suit : 1^o le mesurage des doses minimales du liquide (0 cm³ 01), ce qui exige des pipettes spéciales ; 2^o la nécessité de l'étalement de la trace de matière sur une épaisseur régulière, et sa limitation exacte par des contours tracés d'avance, puisque la numération n'intéressera qu'un nombre de champs peu nombreux (jusqu'à 20) et choisis au hasard.

Tout cela dépend entièrement du savoir-faire particulier de

l'opérateur. Les auteurs mêmes l'indiquent ainsi — « dans la numération sous le microscope, interviennent d'abord l'art et la patience de l'analyste ». Cette « finesse » excessive de la méthode empêchait sa large utilisation.

Les autres variantes, proposées par différents auteurs, qui apportaient telles ou telles modifications dans les différents détails de la méthode, ne touchaient pas à ce défaut fondamental. Telle est, par exemple, la variante d'OLAV SCAR, qui présente une description méthodique de la coloration de la préparation avec application de la coloration *in vitro*, de légères modifications concernant la limitation de la place occupée par le prélèvement à examiner, région du champ, etc., mais dont le fond même est inchangé : appréciation du nombre moyen des cellules contenues dans la quantité minimale mesurée de matière, par une série de numérations effectuées dans quelques champs strictement limités. Enfin, dans la littérature spéciale, fut signalée de nouveau la modification de FROST, déjà proposée plus tôt, — ou méthode des « microcultures » — qui se présente comme une combinaison de la méthode ordinaire des plaques de KOCH avec la méthode de BREED ; cette variante a été exposée en détails par CLARENBURG.

Le principe de la méthode de FROST est le suivant : 0 cm³ 1 du liquide à examiner est ajouté sur l'objectif stérilisé à une goutte d'agar alimentaire liquide, le tout est étalé également sur la surface de 5 cm² limitée auparavant. Après refroidissement de la préparation, on l'enferme dans la chambre humide et on la laisse ainsi 6-10 heures à l'étuve. Pendant ce temps, les germes contenus dans la préparation se développent. Les colonies sont ensuite dénombrées sous le microscope. La technique de la numération est la même que dans les méthodes précédentes.

Comme avantages de cette méthode, on donne : 1^o un encombrement plus petit en comparaison avec la méthode ordinaire des plaques ; 2^o une réduction considérable du temps compris entre le moment de l'ensemencement et celui de la numération (6-10 heures au lieu de 2 à 3 jours). En s'appropriant les avantages de la méthode de BREED, cette méthode en a également conservé les défauts (difficulté du mesurage de trop petites quantités de matériel, difficulté dans l'obtention d'un étalement régulier, etc.).

En résumé, de l'aperçu des méthodes actuelles de numération des microorganismes, il faut avouer que, malgré de nombreux essais, en partie bien conduits et même, jusqu'à un certain point, réussis, on n'a pu, jusqu'à ce jour, faire éclore une méthode qui, en écartant les défauts de la méthode « classique » des plaques, pourrait rivaliser avec elle par la simplicité et le pratique de la technique d'exécution.

C'est justement cet état de choses qui a incité le professeur

S. A. KOROLEFF à rechercher de nouveaux principes pour la création d'une méthode pratique de numération des microorganismes. En parcourant la littérature étrangère, il fut mis en éveil par une petite note concernant cette question, et n'ayant pas attiré l'attention particulière des spécialistes. Cette note faisait mention d'un article de DREYER paru dans le *Journal of Americ. Medic. Assoc.* (Vol. 77, 1921), et figurait dans *Centralblatt f. Bact.*, II Abt., Bd 57, N 18/24. Cette note relatait laconiquement que l'auteur avait proposé pour la numération des corps sanguins et des bactéries la « méthode suivante » : « des cellules nucléées sont fixées par le sublimé, lavées trois fois au sérum physiologique ; puis en solution physiologique, après addition d'une petite quantité de formol, on prépare une suspension standard contenant 30.000 cellules par millimètre cube. Pour la numération des cellules dans le produit à examiner, une partie connue de la suspension standard est mélangée à une partie fixée de ce produit, le tout additionné de quelques gouttes d'une solution de bleu de méthylène à 5 %. Dans une rangée de champs, sont numérées d'une part les cellules à noyaux, d'autre part, les cellules du produit analysé ; de cette manière, on détermine le nombre relatif de ces dernières par rapport au nombre des cellules de la suspension. De là, en tenant compte du « titre » de la suspension, il est très facile de dénombrer le nombre absolu des cellules contenues dans le produit examiné »

Voilà tout ce que put tirer le professeur S. A. KOROLEFF de la note précitée. La nature des cellules utilisées par DREYER pour préparer la suspension standard restait inconnue, et, cependant, c'était là la clef nécessaire à l'application pratique de la méthode. Mais l'idée elle-même était lumineuse et semblait devoir être féconde.

En effet, le principe énoncé par DREYER doit sa valeur à ce qu'il paraît écarter les parties les plus critiquables de la méthode de BREED : 1° la quantité du matériel nécessaire pour effectuer l'étalement peut être ici tout à fait quelconque, seuls les volumes nécessaires au mélange du liquide examiné et de la suspension standard doivent être déterminés, mais il n'y a aucune nécessité à réduire ces volumes au minimum et à prendre, par exemple, moins de 1 cm³ ; 2° la limitation précise de l'étalement est sans importance puisque la grandeur cherchée ici n'est pas le nombre absolu des cellules dans un volume fixé, mais le rapport entre les nombres des éléments de différente nature qu'on peut facilement distinguer et qu'on observe dans les mêmes champs de la préparation ; 3° le remplacement des grandeurs absolues par les grandeurs relatives supprime l'une des plus dangereuses exigences de la méthode de BREED, de laquelle dépend le plus la précision du résultat et qui est en même temps la plus difficile à

satisfaisant en pratique : la régularité précise de l'épaisseur de l'étalement.

Tenant compte de tous ces avantages indubitables du principe de DREYER, le professeur S. A. KOROLEFF s'est efforcé de trouver une technique rendant possible sa large utilisation.

Le point essentiel consistait en la recherche du matériel nécessaire pour la préparation de la suspension standard. Ce matériel doit, en effet, satisfaire aux demandes suivantes : 1^o les éléments choisis (microorganismes ou particules inorganiques) doivent posséder des particularités quelconques de structure que l'on puisse facilement distinguer sous le microscope et qui permettent de les différencier nettement dans une préparation mixte pouvant contenir tous éléments microbiologiques (bactéries, moisissures, spores, etc.) ; 2^o ces éléments doivent posséder la propriété de se répartir également, un par un, dans le liquide, sans tendance visible à former des amas ; 3^o enfin, le matériel cherché doit pouvoir être facilement trouvé et en grande quantité.

Dès le début de son travail, le professeur S. A. KOROLEFF a fixé son attention sur les cellules des levures, qui, par leur grandeur, sont faciles à distinguer des bactéries. Cependant la tendance à former des amas et le bourgeonnement rendent fort difficile la distinction des cellules séparées et peuvent augmenter fortement les erreurs de numération. C'est pourquoi, il a fallu chercher des microorganismes ne présentant pas ces défauts. Dans sa collection, S. A. KOROLEFF a justement réussi à trouver de telles espèces : ce sont des espèces du genre *Schizosaccharomyces* qui se distinguent d'une manière très nette de toutes les autres espèces des levains par leur type de multiplication : elles ne bourgeonnent pas, mais se divisent en deux, en conséquence de quoi elles n'ont pas de tendance à former des amas, leurs cellules se disposent dans le substratum, en général une par une, au maximum par deux ou par quatre. En outre elles possèdent, notamment *Schizosaccharomyces pombe*, une forme originale qui permet de les distinguer facilement de nos ferments ordinaires. Tout cela a incité le professeur S. A. KOROLEFF à choisir cette espèce pour la constitution de la suspension standard. *Schizosaccharomyces pombe* est un ferment exotique (d'origine africaine et retiré de la bière), ce qui le rend encore plus adéquat pour l'usage qui en est ainsi fait expérimentalement, puisque la possibilité de le rencontrer dans nos produits, surtout dans les produits de laiterie, est pratiquement nulle.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

1. PRODUCTION DE LA SUSPENSION STANDARD. — On cultive les ferments mentionnés, en quantité nécessaire (un litre de la suspen-

sion contenant 10.000.000 cellules par centimètre cube, nécessite l'emploi de 5 à 6 tubes de culture), sur agar-agar au moût de bière. Au moment du développement maximum, tandis que n'a pas encore commencé la sporulation ni même la conjugaison des cellules qui lui précède (après 1 à 2 jours pleins de séjour à l'étuve à 30° C.), la culture est enlevée par de l'eau distillée de la surface d'agar. La suspension obtenue est tout de suite bouillie pour tuer les cellules et, en même temps, dissoudre les petites parties d'agar entraînées pendant le lavage ; puis la suspension est centrifugée et lavée plusieurs fois à l'eau distillée. Après une dernière centrifugation suivie de décantation, on reprend les cellules dans une solution antiseptique (solution de phénol ou de sublimé à 5 %) et la suspension totale réalisée est versée dans un matras pour la coloration.

Avant la coloration, il faut laisser se rassembler au fond les cellules, et une partie du liquide est alors évacuée que l'on remplace par un excès considérable (15 à 20 volumes) de solution alcoolique saturée et filtrée de méthyl-violet, étendu 8 à 10 fois d'acide phénique à 5 %. Puis, une agitation énergique permet aux cellules de se répandre régulièrement dans la matière colorante (il faut surveiller l'éventuelle formation d'amas), et le contenu du matras est prudemment chauffé jusqu'à ébullition. Le liquide est alors réparti en tubes pour être centrifugé, ce qui permettra de décanter la solution colorante et de laver 2 à 3 fois les cellules colorées, à l'eau distillée, avant de les mettre en solution phénolée peu teintée. Les cellules, colorées de cette manière, doivent présenter, à l'examen à l'immersion, une teinte violet foncé intense. Si la teinte obtenue est insuffisante, il faut répéter toute l'opération de la coloration.

En définitive, il convient d'obtenir, en milieu phénolé, par exemple, un litre d'une suspension, dont le titre reste au-dessus de celui que l'on veut obtenir. La chambre de THOMAS permet de dénombrer les cellules. Il ne restera plus, à l'aide de la solution phénolée à 5 %, qu'à opérer la dilution nécessaire jusqu'au titre désiré. Le titre commode est le suivant : 10.000.000 de cellules au centimètre cube.

Après un contrôle définitif, on ajoutera à la suspension une petite quantité de la solution saturée de matière colorante (2 à 3 cm³ pour un litre), ce qui accroît considérablement l'intensité et la durée du teint des cellules. La suspension ainsi préparée possède une stabilité, à ce qu'il paraît, absolue : une conservation de quelques mois ne provoquait point de modification ni dans l'intensité du teint des cellules, ni dans le titre.

2. PRODUCTION DU MÉLANGE POUR LA PRÉPARATION. — Dans un but de simplification des numérations, il est plus commode de mélanger le matériel à examiner avec la suspension, en parties égales (1 cm³, par exemple). Immédiatement avant chaque numération la

suspension doit être soigneusement agitée, car les cellules des levains se rassemblent assez vite au fond, et l'homogénéité de la suspension est troublée. Les quantités mesurées du liquide examiné et de la suspension sont versées dans un petit tube (les tubes employés pour l'agglutination sont les plus commodes), que l'on secoue fortement. Aussitôt après on prélève, avec une anse de platine, une goutte de la suspension mixte pour la préparation de l'étalement.

Tout ceci ne s'applique qu'au lait et aux autres liquides. Pour l'examen des substratums « solides » (beurre, fromage), il est nécessaire de les traiter préalablement pour les convertir en suspension homogène.

3. ÉTALEMENT ET FIXATION. — Le point capital est l'homogénéité parfaite de la suspension dont on prélève une goutte : pour cela, il faut agiter vigoureusement le tube et prélever aussitôt après. Les dimensions de l'étalement sont sans importance. La lame est alors laissée au repos, le séchage de la préparation peut être accéléré par chauffage, et la fixation s'opère ainsi aisément.

4. COLORATION DE LA PRÉPARATION. — Quand on ne craint pas la présence, dans le matériel examiné, de cellules difficiles à distinguer des cellules de la suspension standard, on effectue une simple coloration au bleu de méthylène.

Mais, dans tous les cas, la coloration suivante donne de meilleurs résultats : après fixation et refroidissement, on recouvre l'étalement, pendant quelques secondes, de solution de Lugol. La préparation est promptement lavée à l'eau, et, pour quelques secondes, plongée dans l'alcool ; puis, de nouveau, vite lavée à l'eau. Après un séchage prudent (on peut opérer à l'aide de papier filtre), la préparation est colorée, d'une manière ordinaire, au bleu de méthylène (sans chauffage).

En résultat, les cellules de la suspension standard présentent une coloration intense violet foncé et les autres cellules gardent la teinte bleue ordinaire du bleu de méthylène.

Dans les cas où l'on a à examiner une suspension tout à fait homogène (par exemple du bouillon de viande, du lait écrémé) de très bons résultats sont obtenus par une coloration « négative » (méthode de BURRI) : au moyen de l'encre de Chine, du collargol, de la nigrosine.

5. NUMÉRATION DES CELLULES SOUS LE MICROSCOPE. — Pour la numération des cellules on emploie l'objectif à immersion.

Cette numération même est faite de la manière suivante : dans chaque champ, sont dénombrées à part les cellules de la suspension standard et les autres cellules. Les chiffres obtenus dans chaque catégorie sont additionnés et le nombre des cellules de la microflore

examinée est divisé par le nombre des cellules de la suspension standard ; au quotient obtenu on ajoute le nombre de zéros correspondant au titre de la suspension (le titre étant, par exemple, « 10.000.000 », on ajoute 7 zéros).

Le nombre de champs examinés dépend : 1° de la densité des cellules dans le matériel prélevé ; 2° du degré de précision exigée. Plus les cellules apparaissent rares dans la préparation, plus on doit examiner de champs différents. Quand chaque champ contient, par exemple, quelques dizaines de cellules, on peut se contenter d'examiner 20 champs ; quand le nombre des cellules tombe à quelques rares unités, on recommande d'augmenter le nombre des champs examinés (jusqu'à 40-50), au contraire, une trop grande densité des cellules (50 et davantage) permet de limiter l'examen, à une dizaine de champs.

APPLICATION DE LA MÉTHODE A DES FINS SPÉCIALES DE LA PRATIQUE DU LABORATOIRE. QUELQUES DONNÉES RELATIVES A SON INTÉRÊT PRATIQUE ET A SA PRÉCISION

I. COMPARAISON DES RÉSULTATS DE LA NUMÉRATION DIRECTE AVEC LES DONNÉES DE LA NUMÉRATION DES COLONIES AU MOYEN DES PLAQUES DE PÉTRI EN CE QUI CONCERNE L'EXAMEN DU LAIT CRU. — On a procédé à la numération des bactéries dans une série d'échantillons de lait cru de différents degrés de fraîcheur et de pollution, d'une part, directement sous le microscope, d'autre part, d'après l'examen des colonies obtenues sur plaques de PETRI ensemencées, en même temps, à l'aide d'une partie de l'échantillon utilisé pour la numération directe.

Les chiffres obtenus ont permis de comparer les deux systèmes de numération, de noter les différences, de se rendre compte de la grandeur de l'erreur probable. La quantité de lait prélevée et le nombre de champs examinés variaient selon les opérations. Ces recherches ont porté sur un total de 280 échantillons et nous avons retenu les conclusions suivantes :

I. La méthode de numération directe donne un nombre de germes toujours plus élevé que la méthode des plaques. Le pourcentage de cet excès (par rapport au nombre obtenu par la deuxième méthode) atteint, en général, 100 %, et exceptionnellement 800 à 900 %.

Il est à observer que c'est dans le lait frais (encore chaud), qui ne contient pas plus de 3 000 000 de bactéries au centimètre cube, que la divergence entre les résultats des deux méthodes est la plus grande — l'excès, établi comme précédemment, étant d'environ 120 % ; pour le lait contenant de 4.000 000 à 11.000 000 de germes au centimètre cube, le pour cent de l'excès des résultats de la numé-

ration directe est, au contraire, plus petit — environ 14 %. Enfin, pour le lait contenant des dizaines et des centaines de millions de bactéries, le pour cent de l'excès se tient à la moyenne d'environ 100 %.

De ces données, il ressort clairement que la divergence entre les résultats des deux méthodes, en général, est assez considérable ; mais il faut, en même temps, remarquer qu'elle est telle, principalement grâce au fait que, dans cette série d'expériences, ont été utilisés un nombre considérable d'échantillons de lait ou bien trop frais (contenant une proportion extraordinairement faible de bactéries), ou bien trop vieux, acide, et témoignant d'une évolution microbienne très avancée. Le groupe d'échantillons de lait de fraîcheur moyenne, avec une teneur modérée en microorganismes — dans les limites de grandeur les plus ordinaires de notre pratique — fournit justement des résultats peu divergents. C'est pourquoi, pratiquement, dans l'immense majorité des cas, l'application de la méthode de numération directe n'amène pas à des résultats faux, dans l'appréciation du lait, même si nous adoptons sans réserve les normes établies, pour l'appréciation, d'après les résultats de la méthode des plaques. Les causes principales qui provoquent la divergence sont : 1^o la présence dans le substratum examiné de cellules mortes qui ne sont pas numérées par la méthode des plaques ; 2^o la présence de cellules qui, bien que vivantes, ne formeront pas de colonies sur le milieu offert et dans les conditions données.

II. La précision de la méthode de numération directe caractérisée par les différences notées dans ses résultats et la grandeur de l'erreur probable, s'est montrée considérablement plus faible que la précision apportée par la méthode des plaques, ce que l'on voit par le tableau suivant :

TABLEAU I.

Degré de fraîcheur du lait	Différences (pour 100) obtenues à la numération des échantillons d'un même lait frais (encore chaud).	
	Numération directe	Méthode des plaques
Lait frais (encore chaud)	23,2	8,5
Lait conservé pendant 8-24 heures	12,5	5,2
Lait conservé plus de 36 heures	12,6	11,1

Comme il fallait s'y attendre, les plus grandes différences, notées lors de l'examen des différentes préparations d'un même lait apparaissent surtout pour le lait frais (encore chaud) : les conditions de la numération directe y sont les moins favorables, le nombre des cellules contenues dans chaque champ étant faible (moins le grossissement utilisé est fort, plus la précision de la lecture est grande).

En tout cas, on peut dire que, pour un lait contenant plus de 1.000.000 de germes au centimètre cube, la nouvelle méthode se distingue peu, par la précision, de la méthode des plaques. Quant aux échantillons à faible teneur microbienne, le degré de précision obtenu peut être considéré comme tout à fait suffisant, puisque l'appréciation du nombre des microbes doit se borner, du point de vue pratique, à l'obtention d'un ordre de grandeur (dizaines, centaines de mille).

Les deux tableaux suivants donnent les résultats obtenus par les deux méthodes comparées, dans une série d'analyses, et signalent, pour chaque cas, l'erreur probable entachant chacune d'elles.

TABLEAU II.

« ERREUR PROBABLE MOYENNE » DANS LA DÉTERMINATION DU NOMBRE DE BACTÉRIES D'UN LAIT DE FRAICHEUR MOYENNE, EFFECTUÉE AU COURS DE 10 ANALYSES (EXAMEN DIRECT DE 20 CHAMPS POUR CHAQUE ÉTALEMENT, ET, SIMULTANÉMENT, EXAMEN DE 10 PLAQUES).

N ^o	Numération directe		Méthode des plaques	
	Nombre moyen de germes au cc ³	Erreur probable moyenne %	Nombre moyen de germes au cc ³	Erreur probable moyenne %
1	10.560.000	12,47	6.140.000	2,42
2	7.880.000	18,52	1.264.000	11,82
3	7.300.000	20,92	5.974.000	5,07
4	6.360.000	12,20	4.800.000	5,40

TABLEAU III.

« ERREUR PROBABLE » DANS LA DÉTERMINATION DU NOMBRE DES BACTÉRIES CONTENUES DANS DES CULTURES, EN LAIT STÉRILISÉ, DE DIFFÉRENTS AGES, DE STREPTOCOCCUS LACTIS (5 PRÉPARATIONS ET 5 PLAQUES).

	Numération directe		Méthode des plaques	
	Age de la culture	Nombre de germes au cc ³ Erreur probable	Nombre de germes au cc ³	Erreur probable
1. Aussitôt après l'ensemencement		602.000 19,05	60.636	25,36
Culture de 3 h...		8.200.000 24,08	1.906.000	8,80
Culture de 6 h...		145.592.000 4,85	29.960.000	11,08
Culture de 12 h...		814.400.000 8,42	471.600.000	3,18
Culture de 24 h...		2.940.000.000 9,2	249.339.000	6,59
2. Aussitôt après l'ensemencement		526.000 10,80	23.420	11,20
Culture de 3 h...		45.000.000 19,40	3.934.000	3,50
Culture de 6 h...		154.600.000 4,10	79.220.000	1,90
Culture de 18 h...		1.920.000.000 7,90	1.500.000.000	3,20
Culture de 24 h...		2.808.800.000 17,00	880.000.000	20,00
3. Aussitôt après l'ensemencement		578.000 19,00	90.420	9,78
Culture de 6 h...		233.600.000 0,25	90.740.000	0,14
Culture de 12 h...		990.400.000 19,60	599.600.000	9,20
Culture de 48 h...		5.721.040.000 15,70	504.200.000	1,80
Culture de 120 h...		5.510.000.000 18,00	42.000.000	12,75

De l'examen de ces chiffres, nous pouvons noter, que en moyenne, l'erreur fournie à la numération directe est plus grande que celle due à la méthode des plaques ; mais, cependant, le chiffre maximum donné par les deux méthodes est presque le même : nous voyons ainsi que la grandeur de l'erreur probable, dans les deux méthodes, dépend de la nature du matériel examiné.

Pour terminer, relevons les données qui établissent le rapport entre la grandeur de l'erreur et le nombre de champs examinés.

TABLEAU IV.

N° de l'échantillon	Nombre de champs examinés	Quantité de microbes dans un cc ³	Erreur moyenne %
1	20	970.000	7,94
	40	620.000	7,50
2	20	2.000.000	8,92
	40	1.200.000	6,22
	60	810.000	6,00
3	15	830.000	16,50
	30	800.000	10,60
	60	700.000	6,60
4	10	250.000	22,40
	20	110.000	21,20
	40	110.000	9,10
5	20	600.000	14,70
	40	1.500.000	10,60
	60	1.400.000	9,50
	80	240.000	8,00

Comme il découle de ce tableau, en élevant le nombre des champs examinés, on peut abaisser fortement l'erreur relative, et l'on obtient alors une précision tout à fait suffisante pour ce genre de recherche bactériologique.

**SIGNIFICATION ET PLACE DE LA MÉTHODE DE NUMÉRATION DIRECTE
DANS LE PLAN GÉNÉRAL DU TRAVAIL ANALYTIQUE.**

En conclusion de cet article, il faut indiquer, qu'en prouvant le grand intérêt de la nouvelle méthode, nous n'avons eu, en aucune manière, l'intention de la voir remplacer la méthode des plaques, et de refuser désormais tout crédit à cette dernière. Bien au contraire, nous sommes tout à fait persuadés que les deux méthodes doivent être conservées, chacune d'elles possédant des avantages particuliers, toutes deux se complétant souvent l'une l'autre. Pour la

meilleure recherche de la vérité, nous devons, non pas remplacer une méthode par l'autre, mais les employer simultanément ou individuellement selon le but poursuivi.

Quand la composition qualitative de la microflore examinée nous est plus ou moins inconnue, *a priori*, les méthodes basées sur la culture des germes doivent retenir notre attention. Mais si l'analyse qualitative des germes n'entre pas dans nos projets, si nous nous intéressons seulement à la numération quantitative de tous les éléments présents, la méthode de numération directe reçoit une large application. C'est ainsi que nous opérerons, par exemple : 1^o quand nous voudrions étudier simplement, dans des cultures pures, la vitesse de développement des germes ; 2^o quand nous nous intéresserons exclusivement à l'intensité des processus microbiologiques dans le substratum donné, indépendamment de la qualité des éléments composant la microflore.

La numération directe prend un intérêt particulier quand nous sommes fondés à supposer que le substratum examiné ne contient pratiquement pas de cellules mortes (par exemple, dans le cas du lait cru, frais). Dans de tels cas, nous sommes fondés à admettre que le chiffre fourni par la numération directe, dans les limites de la précision qu'elle permet, correspond tout à fait au nombre effectif des cellules vivantes ; c'est pourquoi, dans ces cas, tout au moins, la méthode de « *numération directe* » peut, sous tous les rapports, remplacer la « *méthode des plaques* ».

BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE

1^o LES LIVRES

BEAU (E.). — **La caséine** (2^e partie). Une broch. 127 p., nomb. fig. *Le Lait*, édit., Paris 1933. Prix : 45 frs. les deux parties.

J'ai eu déjà le plaisir de communiquer aux lecteurs du *Lait*, mes impressions sur la première partie de l'ouvrage de M. BEAU. *Le Lait* vient de faire paraître la deuxième et dernière partie de cet ouvrage, qui traite de la *Caséine au point de vue industriel*. En 130 pages d'un exposé très clair, agrémenté de nombreuses figures, l'A. présente les principales données concernant la technique de l'industrie caséinière ; préparation des caillebottes (Chapitre I) ; préparation des caséines (Chapitre II) ; propriétés et usages, contrôle des caséines industrielles (Chapitre III).

Le chapitre IV (Production) et le chapitre V (Consommation) sont réservés aux questions économiques concernant la caséine et sont notamment intéressants par les statistiques, l'étude des prix de revient, des cours et par l'examen de la crise que cette industrie traverse actuellement.

Cet ouvrage, très documenté, complète heureusement la première partie, d'un intérêt plutôt théorique, et j'estime qu'il a sa place auprès de tous ceux qui s'intéressent à la question du lait à un titre quelconque.

A. TAFERNOUX.