

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit

Band: 59 (1968)

Heft: 3

Artikel: Etude critique des diverses techniques de numération : avantages, inconvénients, causes d'erreur, variations

Autor: Novel, Emile

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982169>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Etude critique des diverses techniques de numération

Avantages, inconvénients, causes d'erreur, variations

Par *Emile Novel*

(Service d'hydrobiologie et de microbiologie des denrées alimentaires)
Institut d'hygiène, Genève

Introduction

Aucune technique, aussi minutieusement fouillée soit-elle, ne peut se prévaloir de fournir des chiffres absolus mettant en évidence *tous* les micro-organismes présents dans le matériel soumis à l'analyse.

Le nombre trouvé est, *dans n'importe quel cas et selon n'importe quelle méthode*, toujours au dessous de la réalité. En effet, seules les méthodes sur milieux liquides ou sur milieux solides peuvent permettre d'évaluer le *nombre de germes vivants*. Et encore faut-il utiliser des milieux adéquats et peut-être sélectifs, si l'on recherche uniquement les anaérobies stricts, les levures, les moisissures, les bactéries lipolytiques, par exemple. Seuls les procédés de numération, à l'aide du microscope, permettent d'apprécier le *nombre total des germes*, c'est à dire conjointement des microbes vivants et des microbes morts.

Aucune technique ne permet réellement *l'estimation directe des microbes morts seuls* — à l'exception toutefois de celle de *Knaysi* et *Ford* (1) — dans un produit comportant à la fois et des microbes vivants et des microbes morts.

Quel que soit le matériel analysé, et nous pensons surtout aux nombreuses substances alimentaires comme l'eau de consommation, les eaux minérales, le lait ordinaire, le lait condensé, les laits en poudre, les crèmes et demi-crèmes, les glaces, le beurre, le fromage, les œufs et leurs conserves, les graisses, les huiles, entre autres, c'est évidemment le nombre de bactéries vivantes qu'il est le plus important de connaître.

Et parmi ces germes vivants ceux qu'il convient impérativement de mettre en évidence, ce sont *les micro-organismes pathogènes*. Mais dans ce dernier cas, point n'est besoin, tout au moins dans la pratique courante, d'évaluer leur nombre. La présence d'un seul bacille virulent (bacilles tuberculeux, *Salmonella typhi* ou paratyphiques, *Shigella* de toute espèce, et j'en passe) doit faire rejeter comme impropre à la consommation le produit examiné, car si l'on en découvre, et ce n'est déjà point tâche facile, tant s'en faut, il y en a certainement d'autres que nos moyens techniques modernes, mais limités et imparfaits, ne nous ont pas permis de découvrir.

Mais l'estimation du nombre total des agents microbiens peut être des plus utiles, ne serait-ce que pour nous renseigner sur la quantité des germes qui ont vécu, s'ils ne vivent tous encore, dans le matériel inspecté dans lequel ils ont pu sécréter les produits de leur métabolisme, en particulier leurs *multiples enzymes* et, parfois, *leurs toxines*.

La numération directe au microscope

La numération directe au microscope — comme tous les autres procédés de numération d'ailleurs, nous l'avons déjà dit — ne saurait donner des résultats d'une exactitude absolue. Les causes en sont très diverses et aucune d'entre elles ne peut être à coup sûr et de façon absolue éliminée.

L'avantage de cette méthode réside surtout dans sa rapidité (*Novel* et *Bonifas* [7]). En quelques minutes les opérations préparatoires (fixation s'il y a lieu, puis coloration ou encore simple dépôt à la pipette dans la chambre creuse) sont exécutées et les microbes de la préparation peuvent être immédiatement dénombrés.

Si l'on inspecte une trentaine à une quarantaine de champs microscopiques, par exemple, le résultat final peut être acquis en moins d'une demi-heure, en général.

A. La numération en chambre divisée

Il existe un grand nombre de chambres divisées (de *Thoma* [2], de *Bürker* [3], de *Malassez* [4], d'*Agasse-Lafont* [5], de *Fiessinger* [6], de *Bonifas* et *Novel* [7], etc.) à épaisseur invariable utilisée habituellement pour la numération des éléments figurés du sang. La plupart d'entre elles, plus ou moins modifiées ou plus particulièrement adaptées au but recherché, ont été employées pour le dénombrement des germes inclus dans un liquide quelconque. Or la profondeur des cellules peut être un facteur non négligeable de perturbations apporté au dénombrement et une cause d'erreur importante dans les résultats.

Ce facteur est sans conséquence dans le cas de la numération des hématies du sang, car ces dernières sédimentent facilement et se déposent toutes uniformément sur le fond de la chambre. Elles se trouvent, alors, sur un seul et même plan et sont facilement dénombrables.

Il n'en est pas de même toutefois des micro-organismes bactériens qui, en raison de leur poids spécifique relativement minime, de leur motilité propre ou du seul fait des mouvements browniens restent longtemps en suspension dans le liquide, quel qu'il soit par ailleurs. Comme il y a une infinité de plans dans une cellule de 0,5 mm de profondeur, par exemple, il y a également une multiplicité de mises au point possibles. A chacune de ces mises au point, correspondant à chaque plan différent, on rencontre des agents microbiens: de ce fait la numération est excessivement laborieuse et difficile à réaliser avec exactitude.

Si pour pallier cet inconvénient on fait construire spécialement une chambre de moindre épaisseur, les difficultés techniques de sa parfaite réalisation sont telles que des irrégularités d'épaisseur sont inévitables: cela rend la contenance réelle de la cellule très problématique.

Les numérations effectuées dans ces conditions sont entachées d'erreurs importantes. Si l'on voulait, en effet, rassembler tous les germes sur un unique plan de

mise au point, il faudrait envisager un écartement de l'ordre de 10 μ — et c'est un maximum — entre le fond de la chambre et la surface interne du couvre-objet.

Mais alors, en supposant qu'il soit possible également de l'emplir exactement, la numération, elle, devient pratiquement irréalisable. Prenons en effet une suspension microbienne contenant 1 000 000 de micro-organismes par ml. Avec une cellule normale de 0,5 mm d'épaisseur et d'une surface d'un cm^2 , on aurait 50 000 germes dans la totalité du liquide soumis à l'examen. Etant donné que le champ d'un objectif à immersion 1/12 avec un oculaire III couvre une surface de 0,00887364 mm^2 , l'on pourrait déceler 4 à 5 bactéries par champ.

Avec une cellule de 10 microns d'épaisseur, le nombre de microbes visibles dans un champ microscopique serait 50 fois moins important. Il faudrait donc «visionner», en moyenne, 10 champs pour mettre en évidence un seul germe. On serait, en conséquence, dans la stricte obligation d'inspecter de 200 à 600 champs et même davantage, pour obtenir un chiffre moyen acceptable. La perte de temps ne serait point négligeable. Or, si le produit soumis à l'examen peut être beaucoup plus riche en micro-organismes que dans l'exemple choisi, il peut l'être beaucoup moins. Dans ce dernier cas la technique deviendrait absolument inapplicable.

D'ailleurs toutes les méthodes de numération directe, qu'il s'agisse de dénombrement en chambre calibrée ou de numération après dessiccation et coloration, ne peuvent être utilisées que si le matériel à analyser contient plus de 500 000 germes au ml.

Dans toutes les techniques usant de l'examen direct à l'état frais, la mobilité propre des bactéries — des bactéries mobiles, bien entendu — rend difficile un dénombrement exact. Il n'est pas rare, en effet, de voir des microbes traverser à plusieurs reprises durant la numération le champ microscopique inspecté. Pour peu que ces micro-organismes soient nombreux, la numération directe devient difficile: on risque de compter plusieurs fois le même microbe et le résultat devient d'une inexactitude flagrante. De plus, durant le temps employé au remplissage de la chambre divisée et pendant la durée du dénombrement, il est impossible, sans précautions particulières comme l'adjonction d'antiseptiques ou l'action d'une température élevée, d'éviter la multiplication des bactéries, d'où nouvelle cause d'erreur.

Afin de stabiliser les suspensions bactériennes, nous avons vu (*Novel* [8]) que certains expérimentateurs ajoutaient une quantité connue d'un colloïde tel que la gélose ou la gélatine. Ce faisant, les éléments microbiens étaient enrobés dans une sorte de gelée et étaient contraints à l'immobilité. La numération devient donc possible et ne comporte ainsi plus d'erreurs dues à la mobilité des germes vivants. La stabilisation colloïdale a d'autres avantages. Elle permet, d'une part, la distribution régulière des bactéries dispersées dans le matériel. Il convient, cependant, dans ces cas, d'attendre de 20 à 24 heures environ après la préparation de la lame porte-objet avant d'entreprendre le dénombrement, afin que les micro-organismes puissent sédimenter et se déposer sur un seul plan, ce qui évite la difficulté —

et les erreurs consécutives — de mises au point fréquentes au moyen de la vis micrométrique. Mais est-on sûr que, durant le temps d'attente, il n'y ait aucune multiplication microbienne? D'autre part, l'adjonction d'un colloïde stabilisateur évite la formation d'un courant central, riche en microbes, dans la pipette capillaire servant au remplissage des cellules.

L'adjonction d'hématies en vue d'établir le rapport globules rouges-microbes décelés dans un ou plusieurs champs microscopiques est un procédé qui comporte également des erreurs inévitables.

Il faut prendre garde, en effet, à la provenance des hématies: le dénombrement de ces dernières peut présenter, même chez un homme sain, une variabilité assez grande. On admet, en moyenne — mais ce n'est qu'une moyenne! —, qu'il y a environ 5 millions de globules rouges par mm^3 . Mais il peut y en avoir évidemment aussi bien 4 900 000 que 5 100 000, sans qu'il s'agisse pour autant d'un cas pathologique. L'on sait également que le nombre des hématies varie sous un grand nombre d'influences (diarrhée, polyurie, sueurs profuses, diminution de tension de l'oxygène de l'air, etc.). La femme notamment possède normalement une moindre richesse de globules rouges que l'homme. Il est évident que si l'on calcule le nombre de germes par rapport à la quantité estimée invariable (5 millions par mm^3) d'hématies, il peut y avoir là une cause d'erreur manifeste. Si l'on est obligé alors d'évaluer préalablement le nombre d'hématies dans un sang donné, il vaut mieux — car c'est reculer pour mieux sauter — dénombrer, immédiatement, par une autre technique de numération directe, les bactéries présentes dans le produit soumis à l'examen quantitatif. *Cette méthode n'est avantageusement utilisable que lorsqu'on a à pratiquer une grande série de dénombrements simultanés.* On compte alors une fois pour toutes les hématies du sang «témoin» et l'on se sert de ce sang pour toute la série des numérations.

Si l'on emploie une suspension de levures pour estimer en un rapport mathématique le nombre de germes microbiens, il faut d'abord déterminer le nombre de cellules par unité de volume en utilisant, là aussi, un de mêmes procédés par lesquels on évalue directement le nombre des bactéries.

Il se peut très bien que l'on apprécie inexactement, ou tout au moins avec une approximation plus ou moins véridique, la dilution-standard des levures. La détermination du nombre de germes par rapport au nombre fixe de levures sera, en ce cas, cause d'erreurs systématiques, en ce sens que tous les dénombrements effectués avec la même suspension-standard seront entachés d'un même pourcentage d'erreur.

Il est vrai que l'on peut s'appliquer, en faisant un certain nombre de numérations de la suspension-standard de levures et en en tirant la moyenne, à évaluer correctement la quantité de cellules dans un volume donné. Mais il faut, de plus, que la suspension soit très soigneusement établie de façon telle que chaque élément cellulaire soit réparti également, unité par unité, dans le liquide sans tendance visible à former des amas.

Il est nécessaire encore que l'espèce de Schizosaccharomycetes choisie se multiplie bien par scissiparité, et non par bourgeonnement, car alors la distinction des

cellules séparées devient fort difficile ce qui implique obligatoirement une cause nouvelle d'erreur de numération.

L'avantage des deux dernières méthodes réside dans le fait que la quantité de matériel utilisé pour effectuer l'étalement peut être tout à fait quelconque. Seuls les volumes nécessaires au mélange du liquide examiné et de la suspension-standard (sang, levures) doivent être exactement déterminés. Mais il n'y a dès lors, aucune raison majeure à réduire ces volumes au minimum possible et à ne prélever que moins d'un ml³ pour préparer le frottis. La limitation précise de ce dernier sur une surface donnée est sans importance puisque la grandeur cherchée n'est pas le nombre absolu de microbes dans un volume connu, mais le rapport entre le nombre des cellules (hématies ou levures) qu'on peut facilement distinguer et le nombre de microbes visibles, éléments qu'on dénombre séparément dans les mêmes champs microscopiques.

Le plus grand reproche que l'on puisse adresser à la numération directe — indépendamment du fait qu'elle est inapplicable dans le cas d'une analyse comportant moins de 500 000 germes par ml³ — est l'impossibilité de donner des renseignements concernant le «status» des bactéries (vivantes? mortes?) visibles à l'inspection microscopique. En effet, les micro-organismes mobiles et vivants ne sont pas tous actifs au moment de l'examen; les éléments immobiles sont indifférenciables, qu'ils soient à l'état de cadavres ou en pleine vitalité, leur aspect morphologique étant semblable.

Nombre d'auteurs ont pensé tourner la difficulté en usant de la coloration vitale. Comme on le sait, les cellules vivantes offrent une grande résistance à la pénétration de solutions colorantes, même très diluées et même à celles qui sont dénommées vitales.

Cette résistance a pourtant des limites et certaines cellules, bien que montrant une vitalité réelle, absorbent le colorant et se teintent légèrement. Les individus morts se colorent plus aisément et plus intensément au moyen des mêmes solutions dites «vitales». Mais, même pour celui qui a l'habitude d'observer microscopiquement les bactéries, la ténuité de ces micro-organismes est telle qu'il lui est bien difficile d'apprécier, après coloration, l'état de vitalité ou de léthalité selon la réaction tinctoriale de leur cytoplasme. La distinction est périlleuse et le micrographe, aussi habile et expérimenté soit-il, est bien forcé d'avouer qu'il ne peut faire d'une façon certaine la discrimination entre un microbe mort et un microbe vivant à la simple inspection microscopique après coloration vitale.

Si des cellules encore vivantes, en effet, peuvent être pénétrées par le colorant et si la majorité des microbes, sinon tous, sont colorés, il est bien difficile, pour ne pas dire impossible, de trouver un critère permettant de déterminer, à coup sûr, et les éléments vivants et les éléments morts.

C'est à une telle conclusion qu'arrive *Bickert* (9), qui, après avoir expérimenté les procédés de *Mosso* (10), de *Ruzicka* (11), de *Proca* (12), ainsi que les modifications apportées à cette dernière par *Kaiser* et *Beattie* (13), et de *Seiffert* (17), affirme qu'aucune d'entre elles n'autorise à différencier les microbes morts des vivants.

La méthode de *Knaysi* et *Ford* (1) que nous avons signalée ne se montre guère plus sensible et ne saurait, nettement, être à même de permettre une distinction absolue et péremptoire entre bactéries vivantes ou micro-organismes morts.

B. La numération directe après fixation et coloration

Nous avons vu que la principale variante de la technique de numération directe des organismes microbiens consiste en un examen microscopique d'un frottis fixé et coloré, frottis préparé par l'étalement d'un volume exactement connu de matériel à inspecter sur une surface donnée.

Il s'agit donc de la «confection» d'une préparation selon les temps techniques d'un frottis usuel. Est-il sûr alors qu'il n'y ait aucune perte, aucune «fuite» de microbes durant la phase préparatoire — étalement, dessiccation, fixation — proprement dite? Le seul fait de l'étalement au moyen du fil de platine, même droit, enlève pour le moins quelques unités bactériennes qui vont rester adhérentes à l'anse. Durant la fixation un certain nombre d'éléments cellulaires peuvent être «expulsés» en même temps que le rejet du liquide fixateur. Puis, lors de la coloration, un nouveau contingent de micro-organismes peut être emporté par l'ultime lavage. Il s'ensuit que de toute façon une quantité minime ou importante de microbes — il est impossible ni de la prévoir ni de la calculer — est perdue par le fait même de la technique de la préparation en vue du dénombrement. Il n'est pas rare, surtout dans le cas de frottis de lait, de voir durant le lavage suivant le temps de coloration ou même à n'importe quel moment de la préparation de l'étalement, une pellicule de grandeur variable se détacher et laisser un «transparent» plus ou moins important sur la lame porte-objet. D'autre part, la dessiccation et se craquelent. Quelquefois il se forme un «lit» de substratum desséché qui, à l'inspection microscopique, se montre très hétérogène cachant sous son aspect rocailleux et dans les interstices des craquelures bien des éléments bactériens, qui échappent, de ce fait, à tout dénombrement.

C'est pour cette raison qu'il est opportun souvent de «préparer la préparation» soit par adjonction de liquides appropriés (dégraissants: Xylol, chloroforme ou alcools divers — substances hygroscopiques tel le chlorure de calcium) au matériel initial, soit par des lavages répétés après fixation préalable de ce matériel. Toutes ces manipulations peuvent entraîner la disparition d'une partie des micro-organismes. De plus, l'adjonction de solutions au produit original détermine des dilutions qui peuvent, si elles ne sont pas très minutieusement dosées, provoquer des erreurs dont l'importance varie avec la dextérité opératoire de l'expérimentateur.

Plus les procédés comportent de phases techniques, plus les perturbations peuvent se multiplier. Lors de l'étalement de la substance à examiner, il n'est pas facile d'obtenir un frottis d'une épaisseur constante. Les microbes peuvent être chassés par l'aiguille du fil de platine d'un point à l'autre des limites du carré; ils s'amassent alors en des conglomérats plus ou moins volumineux dans les diverses parties du frottis, ce qui ne va pas sans nuire à une distribution homogène

des éléments bactériens et rend ainsi le dénombrement pénible et sujet à de graves variations quant au nombre des germes décelés dans telle ou telle portion de la préparation.

L'on ne doit pas oublier non plus que, lors de la dessiccation, les microbes, mobiles ou non, sont portés vers le bord de la goutte du fait de l'évaporation plus rapide du film liquide périphérique; il se produit donc un courant du centre vers les bords, courant que la trituration mécanique de la suspension microbienne par le fil de platine ne désordonne que peu. L'on voit par là que la dispersion des individualités cellulaires est difficile à obtenir d'une façon absolument régulière.

On n'utilise, en outre, que de minuscules quantités de matériel à étaler: 1/100 de ml, en général. On trouve des pipettes, quoique difficilement, d'une telle capacité; mais leur exactitude n'est pas toujours parfaite et elles sont d'une fragilité extrême étant donné leur faible épaisseur. De plus, elles sont très sensibles aux différences, même réduites, de température et il est évident qu'elles ne sont jaugées que pour un degré thermique fixe (15 ° habituellement).

En fait, il n'est pas toujours possible d'opérer à une telle température et il n'est pas toujours facile non plus d'amener le matériel à analyser au degré voulu et déterminé. Enfin, n'oublions pas que, selon la densité, le poids spécifique ou la viscosité du produit, ces pipettes spéciales ne donnent plus un volume exact car elles sont généralement jaugées en vue du pipettage d'eau distillée. Il y a donc un facteur de correction à apporter selon la substance soumise à l'examen et selon la température à laquelle on opère.

L'on peut facilement se procurer des anses de platine soudées et contrôlées dont l'oeillet prélève un milligramme, exactement, de matériel. Il est non moins évident que le diamètre intérieur de l'«öse» sera de grandeur différente selon que la charge sera d'un mg d'eau, d'un mg de lait ou d'un mg de crème. L'anse quantitative réalisée par *Dorner* et *Demont* (14) prélevant un mm³ de lait doit avoir 1 mm 50 de diamètre intérieur pour 0 mm 38 de fil de platine irridié. Mais pour charger une anse d'un mm³ d'eau, il faut qu'elle possède 1 mm 10 de diamètre.

L'anse calibrée permet donc de prélever des quantités extrêmement minimes, de l'ordre du mm³ de matériel. Pourtant, tout comme les pipettes, il reste un certain nombre de bactéries adhérentes à l'anse après le dépôt sur la lame porte-objet ou après l'ensemencement en milieux liquides ou en (ou sur) milieux solides. Là encore, il peut y avoir disparition d'un certain nombre de germes qui ne pourront — et pour cause — être présents lors de la numération.

Il est, en conséquence, particulièrement difficile de mesurer exactement de minimes quantités de matériel. Il est également impossible de préparer une quantité définie de suspension originelle de façon telle que toutes les bactéries, sans exception, soient visibles et numérables au microscope. Il est aussi des plus probables que quelques micro-organismes de l'air ambiant s'introduisent sur le frottis durant les diverses manipulations.

En résumé, il est certain que de nombreux facteurs — souvent imprévisibles ou négligés — interviennent dans la préparation même du frottis, facteurs dont l'influence pèse sur l'exactitude, que l'on désirerait mathématique du dénombrement.

Il faut également signaler, comme l'a fait *Breed* (15) les sources d'erreur qui proviennent du manque d'expérience technique de l'analyste et principalement du manque de patience pour l'examen d'une quantité relativement abondante de matériel et d'un nombre suffisant de champs-microscopiques pour obtenir des résultats qui touchent de près à la réalité.

C. Examen direct à l'ultramicroscope

Cette technique n'échappe pas à toutes les difficultés de la numération directe à l'état frais. La mobilité de certaines bactéries, l'impossibilité de distinguer, d'une façon absolue les particules ultramicroscopiques animées de mouvements browniens des bacilles ou cocci immobiles rendent les résultats du dénombrement très aléatoires.

Numération indirecte après cultures

L'inconvénient majeur des procédés utilisant la numération indirecte après culture est la durée prolongée pendant laquelle les cultures doivent rester à l'étuve avant que l'on puisse effectuer le dénombrement et — ipso facto — donner les résultats de l'analyse.

La plupart des techniques exigent, *normalement*, 15 jours, voire 3 semaines d'incubation pour permettre une numération fournissant alors quelques garanties d'approximation suffisante.

L'on a ramené il est vrai, *arbitrairement et conventionnellement* entre 48 heures ou 3 jours, et même 5 jours, le temps d'incubation après lequel on peut compter les germes, mais cela aux dépens de l'exactitude des résultats: en effet, dans ces conditions, *la numération est absolument erronée et les chiffres trouvés sont parfaitement fallacieux.*

Nous l'avons déjà dit et démontré de façon péremptoire dans notre article paru dans cette même revue sous le titre: «De quelques causes d'erreur dans l'analyse bactériologique quantitative» (voir volume 39, 1948, pages 36 à 45).

1. Numération indirecte après cultures sur milieux liquides

La culture en milieux liquides repose — nous l'avons déjà signalé — sur le principe que voici: la dilution du matériel de départ doit être effectuée de manière telle qu'une certaine proportion des gouttes ou de 1/10 de mm³ ne renferme qu'un seul germe alors qu'un certain nombre de gouttes n'en comprennent aucun. Or, la répartition des micro-organismes dans le liquide examiné (qui peut être préalablement dilué s'il convient) est loin de répondre de façon uniforme à ce desideratum. Chaque goutte comporte une variabilité assez marquée quant au nombre de germes qui la peuplent. Il se peut fort bien qu'une goutte ne renferme aucune bactérie, tandis que la goutte suivante en possède 4 ou 3, ou 2 ou une seule.

La première goutte, stérile, ne donnera évidemment aucune culture. La seconde montrera un développement quelle que soit sa richesse en micro-organismes au départ. C'est pour cette raison que les procédés utilisant comme milieux les bouillons ou autres milieux liquides donnent des résultats qui sont, le plus souvent, non seulement inférieurs à ceux que l'on obtient par les méthodes de numération directe — ce qui est normal — mais également à ceux que montrent les techniques de dénombrement en milieux solides.

Mais ce que l'on peut reprocher plus particulièrement à cette méthode, comme à toutes celles qui emploient le procédé des dilutions comme phase préparatoire à l'ensemencement, c'est de conditionner le taux de la dilution préalable au nombre des germes probable du matériel à analyser. Or, comme dans la plupart des cas on ignore tout de la quantité, même approximative, des bactéries qui peuvent se trouver dans le produit dont on veut faire l'examen quantitatif, l'on est bien obligé d'effectuer un grand nombre de dilutions, que l'on peut pousser, suivant les cas, aussi loin que l'on veut, au cent milliardième, par exemple.

En procédant de cette façon, l'on sera certain que parmi les diverses séries de dilutions successives effectuées, une au moins d'entre elles ne renfermera qu'un ou zéro germe par goutte ensemencée.

L'on voit donc que cette méthode — très prisée encore aux Etats-Unis et même en France (*Buttiaux* [16]) exige l'emploi d'une grande quantité de tubes, d'où dépense souvent exagérée de milieux nutritifs liquides et occasionne une perte relativement considérable de temps pour établir les dilutions et procéder aux multiples ensemencements.

2. Numération indirecte après cultures sur milieux solides

La numération indirecte après cultures sur milieux solides comporte — nous l'avons vu antérieurement (*Novel* [8]) — trois modalités principales. Ce sont:

- a) La méthode dite des plaques, comprenant l'ensemencement du substratum liquéfié préalablement.
- b) La méthode des tubes comportant l'ensemencement du milieu préalablement liquéfié.
- c) La méthode des tubes inclinés dont l'ensemencement est effectué sur la *surface solide* du milieu.

Ces trois méthodes présentent des avantages et des inconvénients inhérents à la technique même exigée pour leur utilisation.

a) La méthode des plaques

Cette méthode, classique entre toutes, est celle qui est le plus communément utilisée dans les laboratoires s'occupant d'analyses bactériologiques quantitatives.

Les plaques possèdent l'avantage d'offrir une vaste surface à ensemercer où les colonies peuvent librement cultiver sans trop de risques de confluer. Le nombre de colonies n'est guère limité que par la difficulté technique qu'il y a à les dénombrer. *Neisser* (18) prétend qu'il est possible de déceler, au microscope, jus-

qu'à 1 million de colonies. On peut même, en coulant 20 à 30 ml de milieu dans le Petri ordinaire ou en employant des plaques de 12, 14 ou 18 cm de diamètre, arriver à percevoir, selon *Buchner* et ses collaborateurs (19), toujours microscopiquement de 2 à 5 millions de colonies. Il est vrai qu'en augmentant l'épaisseur de la couche nutritive, l'on rend le dénombrement plus difficile, les colonies se développent à n'importe quelle hauteur du milieu. Elles peuvent ainsi se superposer et se cacher mutuellement, d'où causes nouvelles d'erreur. Au passif de la méthode, l'on peut assurer que du fait de leur surface les plaques se dessèchent assez rapidement, si l'exposition en l'étuve est quelque peu prolongée. Elles sont, de plus, facilement contaminées au moment de l'ensemencement et même durant l'incubation par les germes se trouvant en suspension dans l'air. Enfin elles prennent beaucoup de place dans les thermostats étant donné leur dimension et la durée pendant laquelle elles doivent rester en observation. Le principe même de la méthode a été rappelé, point per point, aussi scrupuleusement que possible, dans cette même revue (*Novel* [21]).

b) *La méthode des tubes*

Cette technique (ensemencement du milieu préalablement liquéfié) dont *Masol* (20) a été le protagoniste, évite une dessiccation rapide du milieu. La contamination par les micro-organismes de l'air est encore possible au moment de l'ensemencement, mais dans une moindre mesure que dans la méthode des plaques; elle est impossible durant le séjour à l'étuve, les tubes étant obturés à l'ouate et recouverts d'un capuchonnage de caoutchouc.

Toutefois, la numération est rendue moins facile, car le culot nutritif constituant la base du milieu incliné est d'une épaisseur dépassant un centimètre: étant donné que ces colonies se développent à des hauteurs différentes dans le substratum, il est évident que si le dénombrement des formations coloniales macroscopiquement visibles dans la partie mince du milieu n'offre aucune difficulté, celui des colonies ayant proliféré dans le culot est beaucoup moins aisé, et même inopérable dès que les colonies sont fort nombreuses. De plus, en raison même de la forme des tubes, on ne saurait pratiquer le dénombrement à l'aide du microscope.

c) *La méthode des tubes ensemencé en surface*

Selon cette technique mise au point par *Burri* (22), les colonies cultivent uniquement en surface. Ce procédé ne peut être utilisé directement que pour un matériel relativement pauvre en micro-organismes. Si le produit est riche en germes, il faut avoir recours aux dilutions préalables. Etant donné que la surface à ensemercer est relativement infime en regard de celle que peut représenter un Petri, elle ne pourra comporter qu'un nombre restreint de germes (150 au plus, selon *Dorner* et *Demont* (14) si l'on veut éviter toute confluence. Il est vrai qu'en utilisant l'anse calibrée prélevant 1 mm³ de matériel à examiner, la technique

peut être employée sans faire de dilutions pour une substance quelconque contenant environ 150 000 bactéries par mm³.

Par ailleurs, la méthode présente les mêmes avantages et les mêmes inconvénients — sauf en ce qui concerne la «lecture» des colonies qui sont toutes, elles, à la surface même du milieu — que le procédé employant l'ensemencement du milieu préalablement liquéfié.

En résumé

Nous pouvons affirmer que:

1. Les méthodes à numération directe possèdent l'avantage de donner très rapidement des résultats qui comportent le nombre total des microbes vivants ou morts.

Elles ne sont utilisables qu'avec des produits dépassant 500 000 germes au mm³.

2. Les méthodes utilisant la numération indirecte après cultures fournissent des résultats ne comprenant que les *microbes vivants* — à l'exclusion probable des anaérobies stricts — dans le matériel examiné au moment de l'inoculum.

Elles sont employables déjà pour des produits ne possédant qu'une unité microbienne dans 10 mm³ et elles peuvent être utilisées également pour des substances très fortement polluées dont la teneur en micro-organismes dépasserait — les dilutions préalables aidant — plusieurs milliards de germes par mm³.

Toutefois, ces méthodes demandent un délai de plusieurs jours à quelques semaines avant de pouvoir donner le résultat de l'examen quantitatif.

3. Toutes les techniques — directes ou indirectes — fournissent des résultats qui sont, obligatoirement, inférieurs au nombre réel des microbes présent dans le matériel soumis à l'analyse. Toutes comportent des causes d'erreur, plus ou moins nombreuses, plus ou moins inévitables ou imprévisibles, qui amoindrissent sensiblement la valeur et l'exactitude des résultats obtenus.

Ce qu'il conviendrait donc de connaître — et pour chacun des procédés — c'est *l'erreur probable et les limites possibles des fluctuations*.

Conclusions

Aucune méthode, aucune technique, aucun procédé d'analyse quantitative ne peut donner *le nombre absolu et réel* des micro-organismes présents dans un matériel quelconque.

D'une manière générale nous pouvons certifier que les résultats obtenus sont certainement et de façon habituelle *en dessous* de la réalité, en raison même de la multiplicité des facteurs de variation qui, pour la plupart, interviennent dans un sens négatif et amenuisent d'autant et en moins la valeur des nombres calculés.

Zusammenfassung

1. Die direkten Abzählungs-Methoden besitzen den Vorteil, sehr schnell zu Resultaten zu führen, die die Gesamtzahl der lebenden oder toten Mikroben umfaßt.

Diese Methoden sind nur auf Produkte mit mehr als 500 000 Keimen/mm³ anwendbar.

2. Die indirekten Abzählungs-Methoden liefern Resultate, die im untersuchten Material zum Zeitpunkt der Impfung nur die lebenden Mikroben umfassen — vermutlich mit Ausnahme der strikten Anaeroben.

Sie können schon für Produkte mit nur einer Mikroben-Einheit/10 mm³ gebraucht werden.

3. Alle Techniken — direkte oder indirekte — liefern Resultate, die kleiner sind als der effektive Mikrobengehalt.
Was bei jeder der Methoden wichtig zu wissen wäre, sind die mutmaßlichen Fehler und die wahrscheinlichen Grenzen der Schwankungen.

Summary

1. The direct counting methods possess the advantage of quickly leading to results that give the total number of living or dead microbes. These methods are applicable only to substrates with more than 500 000 germs/mm³.
2. The indirect counting methods give results that give only the number of living microbes in the sample at the time of inoculation — probably without the strict anaerobes. They can be used on samples with only one microbe unit/mm³.
3. Both direct and indirect techniques give results lower than the real microbes content. It would be important to know the probable errors and the confidence limits of each method.

Bibliographie

1. *Knaysi et Ford*: Une méthode de numération des bactéries dans le lait au moyen du microscope. *J. of Dairy Science*, 1938, 21, 129—142.
2. *Thoma*: Précis de microscopie de M. Langeron, 1942, Masson et Cie., édit. Paris VIe, p. 1037.
3. *Burker*: Münch. med. Wochens. 1905, 52, et Pflügers Arch., 1911, p. 337.
4. *Malassez*: C. R. Acad. Sciences, 1872, p. 1528.
5. *Agasse-Laffont*: Précis de microscopie de Langeron p. 1047.
6. *Fiessinger*: idem, p. 1048.
7. *Bonifas et Novel*: Numération directe des bactéries. *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, 83, p. 142.
8. *Novel*: voir cette revue, 1968, vol. 59, fasc. 1/2.
9. *Bickert*: Différenciation des microbes morts et vivants par les processus de coloration. *Z. Bakt. I*, 1930, p. 548.
10. *Mosso*: *Virchows Archiv.*, 1888, 113, p. 397.
11. *Ruzicka*: *Pflügers Arch.* 1905, 107, 497.
12. *Proca*: C. R. de la Soc. Biol. 1909, 67.
13. *Kayser et Beattie*: cités par Bickert (voir 9).
14. *Dorner et Demont*: *Microbiologie Laitière*. Librairie Payot, 1952, p. 199 à 202.
15. *Breed*: Le contrôle de l'état bactériologique du lait. *Milk plant. Monthly* 1937, t. 26, No 1.
16. *Buttiaux*: L'analyse bactériologique des eaux de consommation. Edit. méd. Flammarion, 1951. Paris 6ème.
17. *Seiffert*: *Zbt. Bakt. I*, 1922, vol. 88 p. 151.
18. *Neisser*: La numération microscopique des plaques et son emploi particulier dans l'analyse des eaux. *Z. Hyg.* 1895, vol. 19, p. 119.
19. *Buchner, Longard et Riedling*: cité par Neisser (voir 18).
20. *Massol*: Les eaux d'alimentation de la ville de Genève. Genève Imprimerie Aubert-Suchard, 1894.
21. *Novel*: De quelques causes d'erreur dans l'analyse bactériologique quantitative. *Trav. chim. alimentaire et d'hyg.* 1948, vol. 39, p. 36 à 45.
22. *Burri*: Les cultures en stries pour remplacer les cultures sur plaques. *Le Lait*, 1929, p. 1028.