LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- A. CLARENBURG — C. F. VAN OIJEN.
— Recherches systématiques sur
la méthode de Frost des petites
cultures sur lames pour le dé-
nombrement des bactéries vi-
vantes dans le lait..... 225
- O. LAXA. — La composition chi-
mique de la glande mammaire
de la vache..... 231
- BLANCHARD — LEROY — LUCAS. —
Quelques travaux de l'Office
Agricole de Seine-et-Oise (à
suivre) 236
- G. ROEDER. — Gerber ou Babcock? 237
- L. ROY. — Le marché des gruyè-
res et la nouvelle fabrication
du gruyère en boîte..... 256

Bibliographie analytique :

- 1^o Les Livres..... 269
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 274
- 3^o Brevets 276

Bulletin bibliographique :

- 1^o Les Livres..... 298
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 301
- 3^o Brevets 302

Documents et informations :

- M. BEAU. — La situation laitière 303
- Ch. PORCHER. — Au sujet du
contrôle des denrées alimentai-
res..... 307
- G. SCHREIBER. — La création
d'une manufacture nationale de
lait sec..... 310
- Rapport au Conseil Municipal
d'Amsterdam concernant un
projet de laiterie municipale... 316
- Le prix de revient du lait..... 317
- Initiative industrielle pour la pro-
preté du lait..... 318
- Le prochain Congrès international
de laiterie..... 319
- Les chambres d'allaitement 320

MÉMOIRES ORIGINAUX ⁽¹⁾

RECHERCHES SYSTÉMATIQUES SUR LA MÉTHODE DE FROST DES PETITES CULTURES SUR LAMES POUR LE DÉNOMBREMENT DES BACTÉRIES VIVANTES DANS LE LAIT ⁽²⁾

par A. CLARENBURG

Docteur en Médecine Vétérinaire, de l'Ecole Vétérinaire d'Utrecht

Résumé du Professeur C. F. van OIJEN, d'Utrecht

La mesure du nombre des bactéries vivantes par centimètre cube dans le lait est évidemment d'une valeur incomparable pour le contrôle de cet aliment. Elle permet d'apprécier, de la façon la plus stricte, l'état de propreté et de conservation du lait.

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

(2) Ce travail est un résumé de la thèse de Doctorat Vétérinaire de l'auteur :
(a) *Een Systematisch onderzoek naar de waarde der Kleine-plaatculturen volgens Frost voor de bepaling van het aantal levende bacterien in Melk.* Librairie F. van Boekhoven à Utrecht. Cette thèse a été faite dans le laboratoire du Professeur van Oijen.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour faire ce dénombrement, mais nulle ne peut donner satisfaction pour les usages courants du contrôle du lait hygiénique.

Selon la méthode de BREED (1), on étend 0 cm³ 01 de lait sur une surface d'un cm² d'une lame porte-objet. On sèche et on colore au bleu de méthylène. On examine à l'objectif à immersion et on dénombre les bactéries colorées apparaissant dans le champ. On examine plusieurs champs et on fait une moyenne. Pour obtenir des résultats que l'on peut estimer exacts le nombre des bactéries doit dépasser 600.000 par cm³. Or, dans le lait qui mérite vraiment le qualificatif *hygiénique*, ce nombre oscille entre 1 et 50.000 ; dans ces conditions, la méthode de BREED ne nous paraît pas propre au contrôle du lait dit *hygiénique*.

La méthode d'OLAV-SKAR peut être considérée comme une variante de la précédente. Le lait et la solution de bleu de méthylène sont mélangés, on étend 0 cm³ 02 du mélange sur une surface de 24 mm. × 20 mm. et on sèche ; puis au microscope à l'immersion, on fait le calcul des bactéries colorées. On trouve ici les mêmes limites d'exactitude, ce qui fait que cette méthode, pas plus que la précédente, ne convient au but poursuivi.

La méthode qui utilise le pouvoir réducteur des bactéries vis-à-vis du bleu de méthylène ne saurait être qu'approximative. Avec elle, on pourra quelquefois distinguer un lait ayant 1 million de bactéries par cm³ d'un autre en ayant 10 millions et plus, mais, pour un contrôle sévère devant porter sur des laits peu riches en microbes, cette méthode est également impropre (BARTHEL, STAPENSEA, DON (1)).

Il nous reste la méthode classique de KOCH qui consiste à ensemencer des milieux de culture avec du lait dilué sur des plaques de Petri et à faire au bout d'un temps donné le dénombrement des colonies. Mais cette méthode a des inconvénients sérieux :

1° Il faut de 2 à 7 jours avant qu'on puisse apprécier les résultats de l'épreuve ; aussi, au point de vue sanitaire, nous sommes placés devant les résultats alors que le lait depuis longtemps est vendu et consommé. Le côté préventif du contrôle n'obtient donc pas satisfaction.

La valeur répressive qu'on peut retirer d'un tel examen est également bien réduite, parce qu'on ne se rappelle pas toujours dans quelles circonstances plus ou moins normales, plutôt anormales même, la pollution du lait a pu se faire ; trop de temps s'est écoulé entre le prélèvement de l'échantillon et l'examen des plaques.

2° Chaque détermination exige plusieurs boîtes de Petri stérilisées, plusieurs pipettes, une grande quantité de milieu de culture ; aussi

(1) Pour les indications bibliographiques se reporter au travail original.

est-il presque impossible de faire journellement des déterminations par la méthode en question sur une échelle bien large.

3° Lorsqu'il s'agit de milieux de culture en gélatine, on rencontre très souvent des espèces microbiennes qui liquéfient celle-ci, ce qui empêche la détermination du nombre exact des microbes ; c'est là un inconvénient qui souvent enlève toute valeur aux épreuves ou ne leur laisse qu'une valeur réduite.

Enfin, ajouterons-nous, la méthode de dénombrement bactérien sur les milieux solides n'est pas la même dans les différents pays. Aux Etats-Unis les plaques sont laissées deux jours à 37° C. ; en Hollande, 5 à 7 jours à 22° C., etc. etc. Aussi la comparaison n'est-elle pas possible entre les résultats des différents chercheurs.

Il nous manquait donc jusqu'ici une méthode de dénombrement des bactéries par cm³ de lait qui fût à la fois *exacte* et *rapide*.

W. D. FROST, professeur de bactériologie agricole à l'Université de Wisconsin, a publié une méthode qui est une combinaison de la méthode d'examen direct de BREED et de la méthode indirecte pour dénombrer les colonies de KOCH-PETRI.

En 1921, FROST en décrivant sa technique qu'il avait améliorée arrive à la conclusion que les résultats qu'elle fournit sont tout aussi exacts que ceux que l'on obtient aux Etats-Unis avec les méthodes officielles. Quelques auteurs américains ont utilisé la méthode de FROST, mais on peut dire que jusqu'à ces dernières années, il n'existait encore aucune étude systématique sur sa valeur.

En effet, en 1923, le Comité des méthodes standardisées de la *Public Health Association* formulait ainsi son opinion, que nous traduisons ici :

« Bien que cette technique ne soit pas recommandée jusqu'à présent comme une technique officielle « standard », nous la décrivons dans ce rapport en raison de la nécessité de voir se multiplier les recherches qui pourraient porter sur elle, afin d'avoir des bases qui nous permettront d'apprécier ses réels mérites. Comme les chiffres obtenus avec la méthode de FROST ne concordent pas exactement avec les chiffres que nous donnent les méthodes standardisées actuelles, cette méthode ne saurait être recommandée actuellement comme une méthode « standard ». Ceci ne doit pas être interprété comme exprimant les vues du Comité que les résultats obtenus par des chercheurs expérimentés utilisant la méthode de FROST sont moins certains que ceux qui sont obtenus par la technique « standard ». Très peu de documents ont jusqu'ici été rassemblés, même en vue d'études comparatives, pour établir l'exactitude des chiffres qu'elle fournit. »

Avant qu'on ne puisse songer à appliquer la méthode de FROST, il fallait donc contrôler rigoureusement les résultats auxquels elle conduit. C'est une question à laquelle le docteur Clarenburg s'est

attelé. Il fallait tout d'abord trouver une méthode de contrôle convenable, à laquelle on puisse comparer avec le plus d'exactitude la méthode de FROST. Evidemment, une seule s'offrait à nous dans ce but : c'est la méthode de KOCH, mais on avait le choix entre les différentes combinaisons des facteurs suivants :

Milieu de culture : gelose ou gélatine,

Température : 37° C. ou 22° C.

Durée du séjour à l'étuve : 2 ou 7 jours.

C'est la combinaison qui donne les chiffres les plus élevées qui doit être choisie.

Les premières épreuves furent exécutées avec de la gelose et de la gélatine à la température de 22° C. pendant 5 jours. 70 échantillons furent examinés et une seule fois seulement les cultures sur gelose ont donné un nombre de bactéries moins élevé que celles sur gélatine. Les moyennes suivantes ont été observées :

sur gélatine : ± 40.000

sur gelose : ± 90.000 .

Il y a donc entre ces deux chiffres le rapport de 1 à 2,25.

La méthode des plaques sur gelose est donc bien préférable à celle des plaques sur gélatine.

Pour la composition exacte des milieux de cultures, leur acidité, etc... il faut se reporter à la thèse.

Dans le but d'abréger la durée du séjour à l'étuve on a élevé la température jusqu'à 37° C. en n'utilisant, il n'est pas besoin de le dire, que les milieux sur gelose, puisque les milieux sur gélatine seraient liquéfiés. Or, les résultats n'ont pas été satisfaisants, parce que le nombre des colonies qui cultivent à 37° C. est beaucoup plus petit que celui que l'on obtient à 22° C. On peut en conclure que les résultats dont font état les méthodes standardisées des auteurs américains, ne peuvent être que tout à fait relatifs, mais jamais ne conduisent aux chiffres maxima.

Aussi, l'auteur a pensé qu'on avait à comparer les résultats de la méthode de FROST à ceux que nous donnent les boîtes de PETRI sur gelose, placées à l'étuve pendant 5 jours à 22° C.

Voici quelle est la descriptions exacte de la méthode de FROST donnée dans le chapitre IV du travail de thèse :

1° Agiter l'échantillon afin de disperser également la matière grasse ;

2° Avec une pipette stérile, on verse 10 cm³ dans un tube à réactif, fermé avec un bouchon stérilisé ;

3° On agite le tube dans le but de disperser les agglomérats microbiens ;

4° Sur une lame porte-objets on dessine 2 carrés de 2 cm. de côté ; on place cette lame après stérilisation dans la flamme, sur un bain-marie à $\pm 45^{\circ}$ C.

Figure 1

Marqueur pour dessiner
les carrés de 4 cm².

Pincettes pour manipuler les
lames porte-objets selon Frost.

Figure 2. — Bain-marie de Frost.

- 5° Une pipette stérile de 0 cm³ 1 est remplie de lait ;
- 6° On verse la moitié de cette quantité sur chacun des deux carrés dessinés ;
- 7° On ajoute à chaque goutte de lait ainsi obtenue la même quantité de gelose qui a été préalablement fondue, puis refroidie aux environs de 40 à 45° C.

8° On mélange immédiatement le lait et la gelose à l'aide d'une spatule de platine flambée et on étend le mélange sur la surface entière du carré, au milieu duquel les deux gouttes de lait et de gelose ont été versées ;

Figure 3. — Chambre humide de Frost en cuivre pour 48 cultures.

Figure 4. — Chambre humide de van Oijen en verre et métal pour 12 cultures.

9° La préparation est numérotée et placée sous une cloche sur un plateau absolument horizontal ; la gelose se solidifie de nouveau ;

10° La lame est mise dans une chambre humide à l'étuve. Plus bas, on trouvera les données exactes sur la durée du séjour dans cette étuve et sur la température la plus favorable ;

11° On sèche la préparation à 90° C. pendant 2 à 3 minutes ;

12° On colore les colonies avec du bleu de thionine après immersion préalable des préparations dans une solution alcoolique d'acide acétique ;

13° On compte les colonies au microscope.

Les recherches que j'ai entreprises m'ont engagé à apporter quelques améliorations des temps qui viennent d'être décrits.

C'est ainsi qu'en ce qui concerne le n° 4, alors que FROST dessine ses carrés sur la lame porte-objets, avec un crayon de cire, j'ai fait construire des lames avec des rectangles gravés ayant 2 cm. de large sur

Figure 5. — Deux préparations de Frost prêtes pour le dénombrement.

2 cm. $\frac{1}{2}$ de long. La surface de ces rectangles est donc de 5 cm² (fig. 6), il en résulte que chaque mm² reçoit ainsi 0 cm³ 0001 de lait, ce qui est très favorable au dénombrement des bactéries par cm³.

J'ai fait construire également un bain-marie de forme spéciale rendant possible le changement de la température de l'eau de 100° à 45° en très peu de temps (fig. 7).

Figure 6. — *a* — chassis avec carrés de 1 mm².

b — lame porte-objet avec carrés de 2 à 2 1/2 cmq. (van Oijen).

Figure 7. — Bain-marie van Oijen.

En ce qui concerne le point n° 10, c'est celui sur lequel le docteur Clarenburg s'est le plus étendu. En effet, la question essentielle dans des recherches de l'ordre de celles qui sont décrites ici, c'est d'être fixé sur l'influence que peuvent avoir la température et la durée d'incubation sur le développement des colonies.

FROST prétendait qu'on pourrait obtenir un nombre que l'on pourrait qualifier d'exact déjà au bout de 8 à 10 heures, alors que les méthodes officielles américaines exigent 48 heures au minimum.

Voici d'ailleurs quelques tableaux qui résument quelques-unes de ses recherches :

TABLEAU I

Comparaison avec la méthode de contrôle

Température	% des échantillons	
	Concordance	Non concordance
37°	40	60
30°	80	20
26°	75	25
22°	59	41

TABLEAU II

Moyennes

Températures	Nombre d'expériences	Méthodes de Contrôle	Méthode de Frost
37°	171	50.000	22.000
30°	24	55.000	57.000
26°	102	37.600	36.300
22°	178	59.000	47.000

On sait que les résultats de deux ou plusieurs déterminations par la méthode de KOCH ne s'accordent pas toujours dans des limites étroites ; il y a des variations même assez notables. Aussi ne peut-on jamais espérer, en admettant que la méthode de FROST donne des résultats de même valeur, qu'une concordance absolue puisse être observée là également. Jamais donc on obtiendra les mêmes chiffres. Une déviation de 10 % dans les nombres donnés par la technique de FROST par rapport à ceux que permet d'obtenir la méthode de KOCH ne saurait préjuger en rien contre elle.

Le tableau II nous montre que les résultats donnés par la technique de FROST entre 26 et 30°, séjournant 24 heures à l'étuve, ont le même degré d'exactitude que ceux qui nous sont offerts par la méthode rigoureuse qui servait de critérium.

La température de 26° me paraît donc de beaucoup préférable.

La durée du séjour à l'étuve est le second facteur qui doit être pris en sérieuse considération. Lorsqu'on porte l'étuve à 37°, on peut déjà déceler des colonies au bout de 8 heures, mais au bout de 24 heures il arrive que la préparation est entièrement couverte de microbes,

parce que les colonies se sont étalées, ce qui rend cette température inapplicable, le calcul ne pouvant être fait.

Cet inconvénient ne s'observe pas à 22° C., mais la durée à l'étuve doit être prolongée pendant 24 heures.

Or, des recherches montrent que les échantillons de lait, — je parle du lait tel qu'il se vend dans les rues, lait courant, lait de, marché, — nous donnent de bons résultats après 12 heures, à la température de 28°. Si l'on examine du lait hygiénique il faut attendre 16 à 20 heures afin d'éviter des erreurs (Voir à ce sujet le chapitre VI de la thèse).

Il reste encore à examiner un point intéressant. C'est celui qui touche au taux microbien du lait et à la manière dont celui-ci doit être dilué, lorsque les échantillons renferment un chiffre très élevé de bactéries par cm³.

FROST indique qu'on doit diluer avec du lait stérilisé, afin de maintenir toujours la même composition du mélange de gelose et de lait. Mais la préparation du lait stérilisé est assez laborieuse, aussi le dit auteur s'est efforcé de pouvoir l'éviter et a essayé d'y substituer une solution de peptone + chlorure de sodium, qui est facile à préparer. De nombreuses expériences permettent d'avancer que cette solution de peptone donne les mêmes résultats que le lait stérilisé quand il s'agit de diluer les échantillons, en raison de leur richesse microbienne.

J'ai également apporté une petite modification au point n° 12 de la technique de FROST. C'est celui qui est relatif à la coloration de la préparation. On prépare la solution suivante :

Bleu de thionine.....	1 gr.
Phénol cristallisé	2 gr. 5
Eau distillée	400
Acide acétique glacial	20 gr.

On fait la solution du bleu de thionine et du phénol dans l'eau. On filtre et on ajoute l'acide acétique. La préparation, une fois séchée comme il est dit au point 11, est immergée pendant 2 minutes dans la solution ci-dessus, puis, on la lave dans l'eau courante et on sèche doucement.

Le point n° 13 relatif au dénombrement microbien appelle aussi des observations intéressantes. On peut, en effet, compter les colonies selon deux manières différentes :

a) On mesure à l'aide des micromètres le rayon du champ visible avec telle combinaison de lentilles et on en calcule la surface à l'aide de la formule : $S = \pi R^2$; la surface du rectangle est 4 cm² et comme elle porte 1/20 cm² de lait, à chaque rayon correspondra 1/20 : 4/8 de lait. On compte le nombre des colonies dans une vingtaine de champs situés sur les deux diagonales du rectangle et on fait la moyenne, d'où l'on partira, connaissant la surface examinée, pour calculer le nombre de bactéries par cm².

Figure 8. — Deux champs avec peu de colonies.

Figure 9. — Deux champs avec plusieurs colonies.

Figure 10. — Deux champs avec d'innombrables colonies.
Il est presque impossible de compter un tel nombre ;
c'est pour cela qu'on doit diluer le lait à l'avance.

Une fois pour toutes on déterminera le rapport 1 20 : 4 S ; il en résultera un chiffre qui sera celui avec lequel on multipliera la moyenne obtenue des dénombrements microbiens.

b) Si l'on opère avec des lames porte-objets portant deux rectangles de 2 cm. $\times$ 2 cm. $\frac{1}{2}$ de côté, nous savons que chaque mm² reçoit 0 cm³ 0001 de lait.

J'ai fait construire un petit châssis portant des carrés d'un mm² (voir fig. 6 a) que l'on pose sur la préparation une fois sèche. La fig. 10 montre comment on peut compter le nombre des colonies qui se trouvent dans une quantité assez faible de lait.

Figure 11

Trois champs avec le châssis ayant des carrés de 1 mm².

Agrandissements: a 10 $\times$; b 20 $\times$; c 40 $\times$.

On voit comment les carrés facilitent la détermination exacte des colonies sur une surface d'un millimètre carré.

Figure 12. — Culture qui a séjourné trop longtemps dans la chambre humide.
Formation de colonies secondaires.

Figure 13. — Marge d'une colonie de microcoques, culture Frost.
Agrandissement plus de 1.000 fois.

Figure 14. — Marge d'une colonie de bactéries, culture Frost.
Agrandissement : plus de 1.000 fois.

S'il n'existe qu'un petit nombre de ces colonies, on compte celles qui se trouvent dans les carrés qui se suivent sur la grande dimension du rectangle, c'est-à-dire sur le côté de 2 cm. $\frac{1}{2}$ de longueur, et on fait la moyenne, puis on multiplie par 400.

Dans d'autres cas, on se contente de calculer le nombre des bactéries qui se trouvent dans 20 à 30 carrés situés ici et là dans toutes les parties du rectangle et on multiplie la moyenne par 10.000 (1).

Je puis résumer ainsi le résultat de mes recherches et de celles du docteur Clarenburg :

1^o La méthode de FROST sur petites cultures en plaques est une méthode *simple, commode, rapide*, pour déterminer le nombre de bactéries par cm³ de lait. Il faut préférer cette méthode à la méthode ancienne des cultures en plaques de PETRI sur gelose ou sur gélatine.

2^o Elle permet l'emploi de peu de milieu de culture, d'un nombre très limité d'instruments et d'une étuve de petit volume.

3^o Avec elle, on peut obtenir des résultats exacts le lendemain du jour de la livraison de l'échantillon, alors que les méthodes anciennes demandaient de 2 à 7 jours.

(1) La maison Marius et C^{ie}, Gansenmarkt, à Utrecht fabrique les instruments spéciaux dont il est parlé ci-dessus. La brochure : *Quantitatief Bacteriologisch Melk Onderzoek* (en hollandais) avec plusieurs figures est envoyée sur demande.

4° Il faut employer la méthode de FROST avec une température de 27° et un séjour à l'étuve de 20 à 24 heures.

5° Les échantillons doivent être dilués au préalable, au cas échéant, avec une solution de peptone + chlorure de sodium, soit au 1/10, soit au 1/100.

* * *

Ainsi que le fait remarquer mon collègue, M. le professeur VAN OIJEN, qui a bien voulu m'adresser ce travail, les expérimentateurs FROST et CLARENBURG ont ainsi introduit dans notre arsenal analytique microbien, une méthode élégante et précise, dont doivent leur être obligés tous ceux qui sont chargés du contrôle hygiénique du lait.

LA COMPOSITION CHIMIQUE DE LA GLANDE MAMMAIRE DE LA VACHE

par le professeur Dr Otakar LAXA.

Nos connaissances sur la composition chimique de la glande mammaire sont, jusqu'à nos jours, restées insuffisantes. Par exemple, nous chercherions en vain les documents analytiques qui illustrent la composition chimique la plus simple de la glande mammaire. Et pourtant, il semble qu'on devrait en tirer quelque chose pour l'explication de la formation du lait.

TABLEAU 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Moyen
Eau	73,79	78,99	79,96	76,12	78,06	78,98	75,28	72,73	73,70	76,40
Matières grasses . . .	12,31	5,62	4,97	8,16	7,50	8,62	10,47	14,13	13,77	9,50
Matières azotées . . .	11,04	11,61	14,50	14,63	13,01	9,79	10,87	11,70	9,38	11,84
Cendres	1,45	1,46	1,28	0,95	1,03	1,24	1,38	0,90	0,98	1,18
Matières indosées . . .	1,41	2,32	0	0,14	0,40	1,37	2,00	0,54	2,17	1,08
Matière sèche	26,21	22,01	20,04	23,88	21,94	21,02	24,72	27,27	26,30	23,60