avec la méthode MAGLIANO et celle exécutée avec la méthode GERBER, aujourd'hui universellement employée.

Coût pour chaque éprouve avec la méthode Magliano.

Solution Fehling B = 3 cc. à 9,06 lire le litre	0,027 lire
Mélange alcoolique = 1 cc. à 14,15 liras les 100 cc.	0,141 »
Total	0,168 lire

Coût pour l'éprouve avec la méthode Gerber.

Acide sulfurique = 10 cc. à 11 lire le litre	0,11 lire
Alcool amylique = 1 cc. à 7,50 lire les 100 cc.	0,075 »
Total	0,185 lire

Il résulte donc que, au point de vue économique, cette méthode jouit de quelques avantages sur les autres méthodes.

LE CONTROLE BACTÉRIOLOGIQUE DU LAIT PAR LA MÉTHODE DE SKAR (1)

par Alexandre NEUKOMM

(A suivre)

INTRODUCTION

Dans un grand nombre de pays, le contrôle bactériologique du lait est pratiqué encore aujourd'hui d'une façon sommaire et irrégulière.

La nécessité d'avoir un tel contrôle est pourtant grande. La consommation du lait est très considérable, il est en outre l'unique aliment du nourrisson, ainsi qu'un adjuvant essentiel de la thérapeutique de nombreuses maladies, parfois même il constitue à lui seul tout le traitement.

Si l'emploi du lait est grand, le nombre des germes qu'il contient ne l'est pas moins, car par lui-même il constitue un excellent milieu de culture. Un contrôle bactériologique du lait peut donc rendre de grands services en empêchant les laits trop souillés de paraître sur le marché.

Si la plupart des bactéries que le lait contient sont inoffensives, il y en a d'autres qui sont pathogènes pour l'homme.

Les saprophytes sont nombreux ; citons parmi les plus fréquents : *B. lactis aerogenes*, *B. acidilactici*, *B. lactis viscosum*, *B. lactis saponacei*, *B. bulgaricus*, *B. acidophilus*, *B. synchyaneum*, *B. prodigiosus*, *B. fluorescens*, *Saccharomyces ruber*, *Tyroltrix*, etc... Tous ces germes n'ont pas d'action directe sur l'organisme humain, mais ils altèrent le lait ; les uns le coagulent, les autres le rendent filant, amer, il y en a qui le colorent, etc... Toutes ces altérations modifient la composition du lait et le rendent moins assimilable et quelquefois nuisible.

(1) Travail paru dans le *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, t. LXIX, n° 1, 1927, et révisé par l'auteur (R.).

Les germes pathogènes altèrent moins le lait, mais leur présence est un danger grave. La plupart d'entre eux sont introduits au cours des manipulations que la lait subit, d'autres proviennent d'une vache malade.

Germes pathogènes provenant de l'extérieur :

Streptocoque	<i>Vibrio cholerae</i>
Staphylocoque	<i>Coryn. diptheriae</i>
<i>B. typhi</i>	<i>M. tuberculosis</i> (var. hominis)
<i>B. paratyphi</i>	Germes de la scarlatine
<i>B. coli</i>	

Germes pathogènes provenant d'une vache malade :

Streptocoque
Staphylocoque
<i>Coccobact. melitensis</i>
<i>B. anthracis</i>
<i>M. tuberculosis</i> (var. bovis)
Germes de la fièvre aphteuse

Nous pouvons nous rendre compte du danger que ces germes présentent pour l'homme d'après les faits suivants cités par COURMONT [11]. D'après SCHEIDER, 17 % d'épidémies de fièvre typhoïde sont dus aux laits infectés ; un grand nombre de gastro-entérites d'enfants est dû au *B. coli* ; en 1914 on signale 18 épidémies de diphtérie causées par les laits souillés ; en Russie la propagation de quelques épidémies de choléra paraît avoir été favorisée par des laits infectés ; 95 % des galactocoques sont des variétés *albus* ou *aureus* du *Micrococcus pyogenes*. MAGGI [32] cite que KOBER a constaté 72 épidémies de scarlatine dues aux laits (Angleterre). Enfin, quelques maladies, comme par exemple la rage, ont pu être transmises, exceptionnellement, expérimentalement par des laits infectés.

L'analyse bactériologique quantitative n'indique pas la nature des germes, mais seulement leur nombre par cm^3 ; mais comme la plupart des bactéries sont introduites dans le lait au cours des manipulations qu'il a subi, il y a beaucoup de chances qu'un lait fortement souillé contient un certain nombre de bactéries pathogènes.

Le contrôle bactériologique du lait est surtout indispensable dans tous les endroits où les épidémies de typhoïde, choléra, diphtérie etc... sévissent ; il est aussi indispensable pour empêcher la vente des laits trop souillés et qui sont de mauvais aliments.

Jusqu'à maintenant, un grand nombre de procédés pour la détermination de la quantité de bactéries par cm^3 du lait furent proposés. Voici les principaux :

On peut tout d'abord se rendre compte de la plus ou moins grande souillure du lait par simple filtrage bien fait. Cette méthode tout en étant très approximative peut rendre de grands services.

Méthode basée sur la réduction (décoloration) du bleu de méthylène. Cette réduction est d'autant plus rapide que le nombre des germes se trouvant dans le lait est considérable. Cette méthode est due à Th. P. MULLER et fut perfectionnée par toute une série d'auteurs, notamment par BARTHEL et ORLA-JENSEN.

Méthode à l'alcool. Le lait suivant le nombre plus ou moins grand des bactéries contenu est plus ou moins vite coagulé par un alcool de degré connu. LÖHNIS [31] recommande l'alcool à 90°, surtout pour les laits peu infectés. Les laits fortement souillés peuvent être traités par des alcools à partir de 68°.

Méthode dite de lacto-fermentation. On place le lait dans une étuve à 38-40° C. jusqu'à coagulation; cette dernière est d'autant plus rapide que le nombre de germes du lait est grand. HISCoux et STARTING [22] recommandent l'échelle due à ORLA-JENSEN.

Méthode de la numération des colonies poussées sur différents milieux ensemencés par des quantités connues de lait. C'est une méthode très répandue. FROST [16] compte sur petites plaques de 4 cm² ensemencées avec 0,5 cm³ de lait et placées durant 4 heures dans une chambre humide (?).

Méthode de comptage direct des bactéries sous le microscope. On compte le nombre de germes dans une quantité donnée de lait et on rapporte à 1 cm³. C'est sur ce principe que sont basées les méthodes de DE'ROSSI, de SKAR et de BREED.

DE'ROSSI coagule 5 cm³ de lait avec 2-3 gouttes d'acide acétique glacial et examine le coagulum sous le microscope. C'est une méthode très rapide, l'examen est fait en 2-3 minutes ou en 5 à 10, si, comme le fait MAGGI [32] on colore les bactéries au bleu de méthylène.

SKAR étale une quantité déterminée de lait sur une surface connue. Un oculaire approprié facilite le comptage des bactéries et indique dans quelle quantité de lait elles sont contenues.

La méthode de BREED est analogue à celle de SKAR.

Toutes ces méthodes ne sont pas parfaites. La méthode au bleu de méthylène donne des résultats approximatifs qui, remarquons-le de suite, sont suffisants dans la pratique courante. Seulement parfois la réduction s'opère d'une façon plus ou moins rapide non seulement en fonction du nombre de germes, mais aussi en fonction de leur nature. Ce phénomène fut bien étudié depuis BULLER par toute une série d'auteurs et notamment par RODRIGUES [37] et MAGGI [32]. La réduction est également faussée comme le constatèrent SKAR [39], van GELDER et LERNER [17] par la présence dans le lait des leucocytes. Les laits anormaux ne peuvent non plus être analysés par la méthode de la réductase. A ce dernier propos, BARTHEL [3] fait remarquer qu'un lait anormal mélangé à un lait normal dans la proportion de 1 : 1 se comporte comme un lait non malade. Enfin, remarquons que la méthode au bleu de

méthylène est une méthode lente, les résultats ne sont obtenus qu'au bout de 5-6 heures. JONE [25] modifia la solution de bleu de méthylène et obtient des résultats d'analyse avant 4 heures, seulement la réduction doit s'opérer à 45° C. ce qui complique la méthode.

Les mêmes critiques peuvent être adressées à la méthode à l'alcool.

La méthode de numération de colonies sur plaques de PETRI n'est guère plus exacte. Souvent certaines bactéries, par exemple les anaérobies, ne se développent pas; parfois comme le font remarquer BREED et STOCKING [6] un développement intense d'une espèce peut masquer et même empêcher le développement de l'autre; les colonies ne sont pas nécessairement déterminées par une bactérie, il faut donc secouer fortement et diluer le lait trop souillé avant l'ensemencement, toutes ces manipulations risquent de l'infecter. La nature du milieu sur lequel l'ensemencement se fera joue un rôle considérable. SUPPLEE, WHILING et DAWES [43] conseillent de l'agar dextriné, KLIMMER et SOMMERFELD [26] un milieu au sérum de lait, les méthodes officielles américaines d'analyse du lait [30] préconisent l'agar peptoné et additionné d'extrait de viande, le pH doit être compris entre 6,5 et 6,6. La température à laquelle les colonies vont pousser et le temps écoulé entre l'ensemencement et le comptage sont aussi à considérer. De même le pouvoir bactéricide du lait qui est très prononcé pour certaines bactéries peut fausser les résultats. DE'ROSSI [13] constate que le *Vibrio cholerae* et le *C. diphtheriae* peuvent être tués dans le lait en 24 h. et HANSEN [19] fait remarquer que le pouvoir bactéricide est augmenté par l'élévation de la température jusqu'à 37°.

La méthode du comptage direct des bactéries est théoriquement parfaite. En pratique les résultats obtenus sont faussés. Ainsi BREED [6] remarque que dans sa méthode primitive les examens se faisaient sur des échantillons de lait de $\frac{1}{300.000}$ cm³ à $\frac{1}{500.000}$ cm³, or, il est impossible de mesurer d'aussi petites quantités exactement; souvent il est difficile de colorer toutes les bactéries, de savoir si les germes visibles étaient vivants ou morts; enfin les bactéries de l'air ambiant peuvent se déposer sur les porte-objets et être colorées.

Il est souvent délicat de comparer des résultats d'analyses quantitatives obtenus par des méthodes différentes, justement grâce à la plus ou moins grande perfection d'une telle ou telle. BREW [8] a comparé les résultats obtenus par le comptage de colonies sur plaques d'agar lactosé (acidité 1,4%-1,5%) placées, après l'ensemencement par le lait, pendant 5 jours à une température de 21° C. avec ceux obtenus par le comptage direct sous le microscope (méthode BREED). Quand les plaques indiquaient 10.000 germes par cm³, les résultats obtenus d'après le procédé de BREED étaient 44 fois plus forts. En général, quand le nombre

de bactéries dans le lait augmenté, la différence entre les résultats obtenus suivant les deux méthodes citées diminue; ainsi quand la plaque donnait 100.000 des germes par cm^3 , le comptage direct n'indiquait un résultat que 5 fois plus fort.

De même les résultats obtenus par la réduction du bleu de méthylène différent de ceux obtenus par toutes les autres méthodes. L'imperfection plus ou moins grande de chaque procédé explique cette non concordance.

La Méthode de Skar

La détermination directe du nombre de bactéries contenues dans 1 cm^3 de lait, d'après SKAR est pratiquée dans les laboratoires d'analyses de denrées alimentaires d'Oslo déjà depuis 1911. C'est en 1912 que paraît la première publication de SKAR [40] relative à son procédé. La publication du travail original est faite dans le « Skand. Veter.-Tidsskr. » Harg II, 1912, N° 8. En 1922 paraît un nouveau travail de SKAR [41] dans lequel il décrit en détail sa méthode perfectionnée depuis 1911.

La détermination du nombre de bactéries d'après BREED est pratiquée en Amérique (E.-U.), où c'est une méthode officielle [30], cette méthode n'est qu'une réplique de celle de SKAR.

La méthode de SKAR a pour base la connaissance de la quantité de lait visible dans le champ de l'oculaire; l'appareil de SKAR permet de connaître cette quantité et facilite le comptage des germes qu'elle contient.

L'appareil de SKAR comprend deux pièces essentielles, à savoir: un porte-objet sur lequel une surface de 500 mm^2 est tracée et un oculaire ad hoc dans lequel deux carrés et un cercle de surfaces connues sont délimités. L'objectif est une immersion à l'huile $1/12$. Avant de porter l'objectif sur la préparation, on règle, à l'aide d'un micromètre objectif la longueur du tube du microscope de façon à ce que le côté du grand carré équivale à 50 μ . La surface de ce dernier sera donc $50 \mu \times 50 \mu = 0,0025 \text{ mm}^2$ ou $1/400 \text{ mm}^2$; les surfaces du petit carré et du cercle seront respectivement de $1/4000 \text{ mm}^2$ et de $1/40 \text{ mm}^2$. Une fois que le réglage est fait on étale sur la surface limitée à 500 mm^2 du porte-objet $1/50 \text{ cm}^3$ (20 mm^3) de lait qu'on veut examiner. Comment calculera-t-on le nombre de germes contenu dans 1 cm^3 de ce lait? La surface visible dans le grand carré est de $1/400 \text{ mm}^2$, c'est-à-dire qu'elle correspond à $1/200\,000$ de la surface totale, car la surface du grand carré est contenue 500 : $1/400 = 200.000$ fois dans les 500 mm^2 . Quelle est la quantité de liquide étalée sur cette fraction? $1/50 \text{ cm}^3$ est étalé sur la surface totale (500 mm^3), sur $1/200\,000$ de cette dernière il y en aura :

$$\frac{1}{200\,000} \times \frac{1}{50} = \frac{1}{10.000.000} \text{ de cm}^3. \text{ Supposant qu'on trouve } N$$

germes dans cette quantité, dans 1 cm³ il y en aura $N \times 10.000.000$. Le principe de la méthode étant connu, passons à la description de la technique.

Étalage du lait sur la surface limitée du porte-objet. Pour prélever $\frac{1}{50}$ cm³ de lait déjà coloré ou non, on se sert d'une pipette appropriée d'une contenance de 20 mm³. L'étalement du lait doit être aussi régulier que possible. Afin de l'obtenir, on procédera avant l'emploi du porte-objet à un dégraissage complet de ce dernier — un bon savonnage dans de l'eau chaude donne d'excellents résultats; enfin, les laits trop gras doivent être dilués dans de l'eau distillée. Nous étions obligés de diluer la crème dans les proportions de 1 : 1 ou de 1 : 2. Pour pratiquer l'étalement, on peut se servir d'une fine spatule en platine ou d'une baguette compte-goutte.

Nous avons obtenu des étalements très réguliers en nous servant uniquement de la pipette de prélèvement et en régularisant à l'aide de différentes inclinaisons imprimées au porte-objet par la main. Une fois l'étalement fait, on laisse le porte-objet dans une position horizontale, à l'abri des poussières, jusqu'à ce que le lait soit sec.

La pipette après chaque prélèvement doit être lavée soigneusement à l'alcool (95°) ou à la potasse chaude. Nous avons employé de la potasse à 30 %.

Coloration des préparations. Il y a différents moyens pour colorer les bactéries du lait. On peut étaler le lait non coloré et le colorer ensuite au bleu de méthylène. Malheureusement le fond de la préparation est très sombre et le comptage des bactéries est difficile. BREED conseille le dégraissage de la préparation avant la coloration; voici comme il procède: la préparation séchée est dégraissée par le xylol, on laisse égoutter ce dernier, on sèche la préparation de nouveau et on fixe pendant 5 minutes à l'alcool à 90°. On colore ensuite au bleu de méthylène de LOEFFLER et on décolore le fond de la préparation avec de l'alcool fort pendant une minute. Comme on le voit, cette méthode est longue et beaucoup trop compliquée; en outre, elle a l'inconvénient de soustraire un certain nombre de bactéries à la préparation. SKAR [41] montra qu'on trouve des germes et des leucocytes dans le xylol qui a servi au dégraissage du lait.

SKAR [41] propose de colorer la préparation de lait séché durant 15 minutes avec une solution de bleu de méthylène à 1,5 % dans l'alcool à 95°, on lave ensuite la préparation délicatement à l'eau et on laisse égoutter. Cette méthode tout en étant préférable à celle de BREED n'est néanmoins pas parfaite: le comptage des bactéries est difficile à cause de la coloration assez forte de la caséine; en outre, en lavant la préparation à l'eau on enlève facilement des lambeaux de lait séché.

Outre cette coloration, SKAR en indique encore deux. La première qui est la plus ancienne [40] consiste à mesurer 4,8 cm³ de lait et de

leur ajouter 0,2 cm³ d'une solution de bleu de méthylène additionnée de potasse. (Formule : 2 gr. de bleu de méthylène sont dissous dans 10 cm³ d'alcool; on ajoute à la solution 100 cm³ de potasse à 2 %). On secoue fortement le mélange et on place l'éprouvette dans une étuve à 70° C. durant 5-10 minutes. Les bactéries sont bien colorées, mais la méthode nécessite une étuve à température fixe et du temps.

En colorant par ce procédé, on dilue le lait à 4 %. On devra donc, une fois le comptage de germes fait, augmenter le résultat de 4 %; ou bien étaler sur les 500 mm² 4 % plus de lait coloré ou encore se servir de porte-objet ayant une surface de 480 mm² (20 × 24 mm.).

Ces porte-objets sont les premiers que SKAR a utilisés et qu'il abandonna ensuite pour les porte-objets à 500 mm², car ces derniers peuvent être utilisés pour toute substance liquide qu'on ne dilue pas. Si on se sert de porte-objets à 480 mm² on a : la surface du grand carré égale à

$\frac{1}{192.000}$ (0,0025 : 480) de la surface totale. La quantité de lait étalé sur cette fraction est $\frac{1}{192.000} \times \frac{1}{50} = \frac{1}{9.600.000}$ cm³. Mais du moment que le lait était dilué par la coloration à 4 %, cette quantité correspondra à $\frac{1}{10.000.000}$ cm³ du lait original non dilué, car le 4 % de $\frac{1}{9.600.000}$

est $\frac{4}{960.000.000}$ et c'est cette quantité qu'il faut soustraire à $\frac{1}{9.600.000}$.

On a $\frac{1}{9.600.000} - \frac{4}{960.000.000} = \frac{1}{10.000.000}$ cm³. Du reste la surface de 480 mm² n'est autre chose que la surface de 500 mm² diminuée de 4 %.

Enfin, la méthode de coloration la plus pratique consiste à mélanger 4,8 cm³ de lait avec 0,18 cm³ de bleu de méthylène préparé selon la formule indiquée plus haut et d'ajouter 0,02 cm³ de potasse à 30 %. On secoue fortement et on étale le lait ainsi coloré. Nous nous sommes servis pour la coloration du bleu du thymol connu sous le nom de bleu de PIANA, que notre maître, M. le Prof. GALLI-VALERIO nous a conseillé et qui nous a toujours donné toute satisfaction.

Si les porte-objets à surface de 480 mm² font défaut, on peut étaler sur 500 mm², mais au lieu de 20 mm³, on étalera 4 % plus, soit 20,8 mm³ de lait coloré.

Les préparations colorées par cette méthode ont un fond bleu ciel sur lequel les bactéries colorées en bleu foncé se détachent très nettement. Le petit lait et la crème diluée peuvent être également colorés avec succès par ce procédé.

Remarquons que les colorations se font dans des éprouvettes de 5 et de 5,2 cm². Les premières contiennent 4,8 cm³ de lait, les secondes 5 cm³ et la dilution dans ce dernier cas n'est plus de 4 % mais de 3,8 %,

l'erreur est insignifiante mais on peut éviter en étalant sur 500 cm³ non 20,8 mais 20,76 cm³.

La numération. Nous avons montré que la surface du grand carré limitait $\frac{1}{10.000.000}$ cm³ de lait, des calculs analogues montrent que le cercle

et le petit carré limitent respectivement $\frac{1}{1.000.000}$ et $\frac{1}{100.000.000}$ de cm³. En outre les différents champs de l'oculaire SKAR sont divisés en quatre par deux axes perpendiculaires. On a donc :

1 bactérie dans le cercle signifie	1.000.000 de bactéries par cm ³
» » $\frac{1}{2}$ »	2.000.000 »
» » $\frac{1}{4}$ »	4.000.000 »
» » grand carré »	10.000.000 »
» » $\frac{1}{2}$ »	20.000.000 »
» » $\frac{1}{4}$ »	40.000.000 »
» » petit carré »	100.000.000 »
» » $\frac{1}{2}$ »	200.000.000 »
» » $\frac{1}{4}$ »	400.000.000 »

Suivant que la préparation est plus ou moins riche en germes on emploiera tel ou tel champ de l'oculaire. On choisira le champ qui contient en moyenne 5-6 germes au minimum.

Pour connaître le taux bactérien, on examine 10 à 50 champs, suivant que les germes sont répartis régulièrement ou non dans la préparation. Dans la plupart des cas, nous avons examiné 20 champs, parfois quand les bactéries étaient agglutinées ce qui arrive de temps à autre dans le lait frais (pouvoir bactéricide?) nous examinâmes 40 champs. On déplace la préparation suivant des lignes droites afin de ne pas compter deux fois les mêmes bactéries. Une platine mobile peut rendre d'excellents services. Les champs où le lait contient trop d'impuretés ou où il est étalé irrégulièrement ne seront pas considérés.

Dans une chaînette de streptocoques chaque élément est compté afin d'avoir le nombre absolu des germes. Exemple de calcul : on a examiné 20 champs, le total de bactéries trouvé dans le cercle est de 82.

On a $\frac{82 \times 1.000.000}{20} = 4.100.000$ bactéries par cm³. On peut aussi mesurer la grandeur des germes à l'aide d'un micromètre oculaire.

L'appareil de SKAR est en vente chez Zeiss à Jéna.

La méthode de SKAR rapide, exacte, facile remplit toutes les conditions pour devenir une méthode de choix dans tous les laboratoires chargés du contrôle du lait.

Récapitulation de la technique employée. 1° 5 cm³ de lait + 0,18 cm³ de bleu au thymol ; on secoue et on ajoute 0,02 cm³ de potasse caustique à 30 % ; on secoue de nouveau ;

2° On prélève 20 mm³ (ou 20,8) de lait colorié qu'on étale sur une surface de 480 mm² (ou 500 mm²) tracée sur le porte-objet. On laisse sécher à l'abri de poussière.

3° On porte l'immersion à l'huile 1/12 sur la préparation et on examine 10-50 champs suivant que les bactéries sont plus ou moins régulièrement dispersées. On compte chaque élément d'une chaînette de streptocoques. Les places où le lait est étalé irrégulièrement ne seront pas prises en considération ;

4° On additionne les nombres des germes trouvés dans chaque champs et on divise le total par le nombre de champs examinés (10 à 50 champs). Suivant que le comptage de germes se faisait dans le petit ou dans le grand carré ou encore dans le cercle, le résultat sera multiplié par 100 millions, 10 millions ou 1 million.

En faisant plusieurs préparations à la fois on arrive à analyser un échantillon de lait en 5-8 minutes. (à suivre).

QUELQUES TRAVAUX DE L'OFFICE AGRICOLE DE SEINE-ET-OISE

(Fin)

par M. MONMIREL,

Président de l'Office agricole départemental de Seine-et-Oise

V. — ESSAIS DE MACHINES A TRAIRE.

M. BLANCHARD, Directeur des services agricoles, frappé par l'emploi de plus en plus généralisé des machines à traire en Belgique et par la nécessité de suppléer à la pénurie de main-d'œuvre a décidé, en 1925, de mettre à l'étude l'emploi rationnel des machines à traire.

A cet effet, l'Office agricole de Seine-et-Oise ouvrit un crédit et des essais furent organisés dans une vacherie de plus de 80 bêtes où l'on put expérimenter deux marques de machines à traire de types différents.

Le contrôle laitier rigoureux exercé dans cette vacherie sur toutes les bêtes de l'exploitation a permis de constituer des lots semblables, donnant la même quantité de lait et de matière grasse. Ce lait provenait de vaches de même poids ayant vêlé à peu près au même moment.

Pour s'assurer de l'homogénéité de deux lots, les bêtes étaient contrôlées chaque jour pendant une période préparatoire et pendant une période finale. L'égalité de rendement pendant ces deux périodes permit d'affirmer qu'une similitude suffisante existait entre les lots et pendant la période intermédiaire d'expérience.

Durant toute la période d'expérience le contrôle du lait fut fait à chaque traite, la traite à la machine du lait en expérience était toujours complétée par une traite à la main qui donnait l'arrière-lait. La présence de cet arrière-lait déterminait la plus ou moins grande valeur mécanique de la machine à traire. Le dosage journalier de la matière grasse et