[33] SCHWARTZENBACH. *Ann. der Chem. u. Pharm.*, 1865, **133**, 185.

[34] E. MILLON et A. COMMAILLE. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, 1865, **60**, 118.

[35] E. MILLON et A. COMMAILLE. *C. R. de l'Acad. des Sc.*, 1865, **61**, 221.

AMÉLIORATION PAR LE LAVAGE DE LA CRÈME DE LAIT ET DE SÉRUM DE FROMAGERIE (1)

par le Dr OTTO GRATZ

Institut Royal Hongrois de Recherches laitières, Magyaróvár.

Dans les pays de petites exploitations agricoles, les circonstances entraînent fréquemment, soit la création de « stations d'écémage », soit l'écémage à la ferme. Il arrive alors souvent que la crème est expédiée à la laiterie, non pas chaque jour, mais seulement une ou deux fois par semaine. On trouve des exemples de cette façon de procéder même dans les pays dont l'industrie beurrière est très importante. En Finlande orientale, par exemple, région de faible population, les agriculteurs n'envoient leur beurre, soit directement de leur ferme, soit par l'intermédiaire de la « station d'écémage », que deux ou trois fois par semaine à la beurrerie. Nous rencontrons très fréquemment ce procédé outre-mer, par exemple aux Etats-Unis, en Argentine, en Nouvelle-Zélande, etc.

Il va sans dire qu'une telle crème, vieille de plusieurs jours, ne saurait fournir un beurre de première qualité. Quelle que soit sa richesse en corps gras — ou ce qui revient au même, quelque faible que soit la proportion des composants non gras, source, comme on le sait, de la décomposition — la crème aigrit, sa surface se recouvre d'*Oidium lactis*, qui décompose la graisse, de nombreuses moisissures apparaissent, par lesquelles la graisse est aussi fréquemment attaquée.

Les « stations d'écémage » étant rarement pourvues des appareils de réfrigération qui permettraient de maintenir une température au-dessous du point de congélation, la crème est conservée jusqu'à la livraison tout au plus entre des morceaux de glace. Le plus souvent cependant, elle reste simplement à la température de la cave ou du dépôt, ce qui permet d'abord l'attaque par divers microbes des composants non gras, tels que le sucre de lait et les matières albuminoïdes, et, par suite, la décomposition de la graisse elle-même.

Pour pouvoir pasteuriser une crème livrée avec un tel degré d'acidité, on a coutume, dans les pays d'outre-mer notamment (Australie, Argentine, Canada, Kénia, Nouvelle-Zélande, Etats-Unis, etc.), de neutraliser les acides avec différentes bases et d'améliorer considérablement de cette façon la qualité du beurre. Par ce procédé, cependant, les acides sont simplement transformés en divers lactates,

(1) Cet article a paru également dans *Molkerei Zeitung* (Hildesheim).

qui subsistent, de même que les matières albuminoïdes, en partie attaquées, les produits de la décomposition de l'albumine et, en outre, une petite quantité de graisse décomposée, facteur d'une décomposition plus étendue.

Toutes ces matières donnent naturellement à la crème et au beurre qu'elle produit une odeur et un goût désagréables. Comme la pasteurisation suit la neutralisation, il n'est plus question de microbes, mais les « enzymes » résistant à la chaleur n'en subsistent pas moins, et ceux-ci se chargent d'accélérer la décomposition du beurre. Comme nous le montrons, la température de pasteurisation ne détruit nullement dans la crème les enzymes qui décomposent la graisse.

Celles-ci restent donc actives dans le beurre produit avec la crème pasteurisée. La partie non grasse de la crème et du beurre est le siège le plus important de la corruption. La partie non grasse n'étant pas autre chose que le lait écrémé (lait maigre), nous pouvons aussi considérer la crème comme un lait très gras. Même après l'écémage le plus poussé, la crème contient encore plus de 50 % de lait maigre. Enlever celui-ci à l'aide du « séparateur », par le moyen de la force centrifuge, n'est pas possible, car une crème contenant 45 à 50 % de corps gras s'obtient déjà difficilement, ou avec perte de graisse, et la proportion de la graisse s'élève dans le lait écrémé.

Ce serait un grand progrès que de pouvoir séparer de cette crème, vieille de plusieurs jours, la partie « lait maigre » et, avec elle, les différents facteurs de décomposition : enzymes, etc. On épurerait ainsi la partie grasse et on ajouterait ensuite du « lait maigre » frais. Ce procédé permettrait sûrement d'obtenir un beurre de meilleure qualité et de composition supérieure.

La séparation de la partie non grasse de la crème se présente encore à nous d'une autre manière. Le beurre de sérum de fromagerie est, comme on le sait, moins bon, d'odeur et de goût moins fins, d'apparence plus grasse. Le beurre de sérum ne contient, cependant, aucune substance caséuse : seulement, à côté de l'albumine et de la globuline, la matière albuminoïde provenant de la caséine et séparée par la présure (albumine de petit-lait ou albumose). Ces matières donnent au beurre de sérum un goût de fromage. La présure contenue dans ledit beurre continue dans celui-ci son action décomposante sur les matières albuminoïdes. Toutes ces circonstances influent très défavorablement sur la qualité du beurre de sérum et c'est une tâche importante que de travailler à une amélioration dans ce sens.

Il faut essayer de récupérer dans un produit meilleur que n'est le sérum de fromagerie, la précieuse graisse de lait qui ne se laisse pas englober dans le caillé et qui passe inévitablement dans ce sérum. Il est bien connu que la crème de sérum donne, si on lui ajoute une cer-

taine quantité de crème de lait, un beurre bien supérieur, appelé, en Suisse, « beurre mélangé » (Mischelbutter).

Si l'on pouvait séparer complètement le sérum dans la crème correspondante, comme cela paraît possible par la centrifugation, et le remplacer par du lait plein ou maigre, ce résultat, joint à la pasteurisation et à la maturation de la crème par les cultures pures, permettrait certainement d'atteindre une amélioration importante de la qualité du beurre de sérum et augmenterait par suite notablement les bénéfices de la fromagerie.

* * *

Comment peut-on cependant réaliser l'idée de séparer complètement le lait maigre plus ou moins altéré de la crème de lait vieille de plusieurs jours, ou le sérum de la crème de fromagerie ? Il y a là pour la technique, un beau et utile problème à résoudre, dont la solution serait de grande importance.

L'idée qui se présente à l'esprit du producteur de beurre est de séparer, de chasser par le lavage la partie non grasse de la crème. Nous lavons bien plusieurs fois les beurres tout prêts pour en séparer le babeurre et, avec lui, les matières albuminoïdes, le sucre de lait, etc. Ou bien, encore, nous rafraîchissons du vieux beurre en le lavant plusieurs fois et en le traitant ensuite avec du lait complet, du lait maigre ou du babeurre. Si l'on obtient ainsi par le lavage une amélioration de la qualité du beurre, ce doit être aussi le cas lorsque nous lavons la crème. C'est ce que doivent expliquer les expériences décrites ci-après.

DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES

Au cours de la description des expériences, lorsqu'il sera simplement question d'un « lavage » répété, ce terme aura toujours la signification suivante : la crème vieille de plusieurs jours a été délayée dans 4 à 5 fois sa quantité d'eau pure, légèrement tiède, mélangée, puis centrifugée. Dans de nombreux cas, cela a été répété 2 fois avec de l'eau ; au total donc, le lavage a été effectué successivement avec 3 eaux différentes, puis la crème a été centrifugée. Après le dernier lavage, on a mélangé avec du lait maigre frais ; le mélange a été naturellement centrifugé de nouveau aussi complètement que possible et la crème ainsi obtenue a été transformée en beurre. Nous avons donc délayé de cette façon la partie non grasse de la crème une ou plusieurs fois avec de l'eau, puis une dernière fois avec du lait écrémé ; nous avons pour ainsi dire rincé les particules de graisse et chassé ensuite, en centrifugeant, l'eau de rinçage, puis le lait écrémé, c'est-à-dire les composants de la crème, dangereux pour la qualité du beurre, qui s'y trouvaient dissous ou en suspension. En d'autres termes, nous avons chassé la partie non grasse de la crème plus ou moins décom-

posée et nous l'avons remplacée par une partie semblable, mais fraîche. A la fin, il ne restait dans la crème qu'une quantité pratiquement insignifiante de la partie non grasse primitive.

Ce procédé demande en vérité un travail assez compliqué, mais une mise au point des appareils employés — cuves de brassage, appareils centrifugeurs — permettra de le réaliser sans difficultés spéciales.

Expérience I. — Après son obtention, la crème reste 7 jours à la température du dépôt. Son degré d'acidité est alors de 30°2 S. H. Elle est divisée en 2 quantités égales. La 1^{re} partie est transformée en beurre sans lavage préalable, après pasteurisation et maturation avec une culture pure. L'autre partie est préalablement lavée. La crème non lavée donne un beurre de goût rance et âcre.

La crème lavée trois fois à l'eau fraîche et une fois avec du lait écrémé a un degré d'acidité maximum de 5°4 S. H. Pasteurisée et mûrie dans les mêmes conditions que la première, elle donne un beurre de bien meilleure qualité. Pour voir si le lavage a également une influence sur la décomposition de la graisse dans le beurre, on a maintenu le beurre un temps assez long dans des capsules dans lesquelles il a été fortement pressé et couvert d'une feuille d'étain imperméable à l'air, puis on a déterminé son degré d'acidité. Les chiffres obtenus sont indiqués au tableau I :

TABLEAU I.

DEGRÉ D'ACIDITÉ DE LA GRAISSE DANS LE BEURRE SELON QU'IL PROVIENT D'UNE CRÈME LAVÉE OU D'UNE CRÈME NON LAVÉE,

Nombre de jours après l'obtention de la crème	Degré d'acidité de la graisse dans le beurre produit avec de la crème	
	non lavée	lavée
3	3,33	3,12
16	10,09	4,06
23	12,89	6,88
28	13,71	7,42
35	15,28	4,15
43	17,58	5,28
56	21,48	6,15
63	26,22	7,45
70	32,48	7,96

Ces chiffres montrent nettement la grande influence du lavage de la crème sur la décomposition de la graisse dans le beurre. Dès le début, cette décomposition progresse beaucoup plus vite dans le beurre de crème non lavée et elle est, au bout de 70 jours, terme de l'expérience, quatre fois plus élevée que dans la graisse de beurre de crème lavée. La crème ayant été pasteurisée avant d'être transformée

en beurre, on peut en conclure que les enzymes de la graisse ont supporté sans dommage la température de pasteurisation.

Expérience II. — Après production, la crème reste 21 jours à la température ordinaire, ce qui représente un long stage à une température défavorable, telle que cela arrive rarement dans la pratique.

La crème est alors recouverte d'une puissante végétation d'*Oidium lactis*. Elle contient des levures et on voit aussi à sa surface quelques colonies de moisissures. L'acidité atteint 33° S. H. La crème est de nouveau pasteurisée en 2 parties, l'une lavée, l'autre non lavée. Après acidification dans un bouillon de culture, elle est transformée en beurre. Le beurre est ensuite jugé d'après le procédé des points (1) et son degré d'acidité est établi. L'examen du beurre est soumis à 3 juges, qui prononcent leur jugement chacun séparément.

Les coefficients obtenus par les beurres de crème non lavée et de crème lavée sont indiqués dans le tableau II :

TABLEAU II.
COEFFICIENTS DES VALEURS DES BEURRES DE CRÈME LAVÉE ET DE CRÈME NON LAVÉE,

Juges	lavée			non lavée		
	G. V. B.			G. V. B.		
Goût	2	6	4	8	8	7
Odeur	1	1	2	2	2	1
Fabrication	4	4	4	4	4	4
Aspect	2	2	2	2	2	2
Texture	2	2	2	2	2	2
	—	—	—	—	—	—
	11	15	14	18	18	16

La crème lavée trois fois avec de l'eau et une fois avec du lait écrémé, n'avait plus qu'une acidité de 6°45 S. H. Pasteurisé, mûri et baratté, le beurre ainsi produit reçoit dans le jugement ci-dessus, un coefficient total supérieur à celui du beurre de crème non lavée. L'influence favorable du lavage sur la qualité du beurre est indéniable. Tous les juges ont accordé des coefficients supérieurs au beurre de crème lavée et le coefficient maximum a été presque atteint.

L'acidité de la graisse dans le beurre de crème lavée et non lavée est indiquée au tableau III. Comme dans la première expérience, nous voyons nettement que, dans le beurre de crème non lavée, la graisse se décompose beaucoup plus vite que lorsque la vieille crème a été bien lavée à fond 3 fois à l'eau et une quatrième fois au lait écrémé avant d'être transformée en beurre.

Expériences III et IV. — Dans ces expériences, la crème a été conservée respectivement 14 et 21 jours dans une chambre froide à

(1) Pour le jugement du beurre, les coefficients maximum étaient ainsi fixés :
Goût : 10 — Odeur : 2 — Fabrication : 4 — Aspect : 2 — Texture : 2 — Total : 20.

une température moyenne de 4 à 8° C. Elle a été ensuite, comme dans les expériences précédentes, divisée en deux parties, l'une lavée, l'autre non lavée, séparément pasteurisées, acidifiées et transformées en beurre. L'acidité de la crème s'élève pendant le dépôt respective-

TABLEAU III.

ACIDITÉ DE LA GRAISSE DANS LE BEURRE DE CRÈME NON LAVÉE ET LAVÉE.

Nombre de jours après l'obtention	Acidité de la graisse dans le beurre de crème	
	non lavée	lavée
1	4,08	3,06
8	12,55	7,43
13	15,96	8,76
20	21,39	9,16
28	26,59	10,90
41	35,39	14,88
48	40,27	15,36
55	44,84	16,71
78	51,93	19,46

ment à 27° et à 28°3 S. H. Le lavage l'abaisse respectivement à 7°4 et 6°5 S. H. La température de la chambre froide n'a pas pu être refroidie pendant le temps de l'expérience. Le lavage a été effectué comme précédemment, 3 fois avec de l'eau et une fois avec du lait écrémé frais. Les résultats sont indiqués dans les tableaux IV et V.

TABLEAU IV.

COEFFICIENT DU BEURRE DE CRÈME LAVÉE ET DE CRÈME NON LAVÉE,

Juges	Expérience III non lavée			Expérience IV lavée		
	V. B. K.	V. B. K.		G. V. B.	G. V. B.	
Goût	7 6 8	5 3 4		6 6 5	8 7 7	
Odeur	1 2 1	1 1 1		1 1 2	1 1 1	
Fabrication	4 4 4	4 4 4		4 4 4	4 4 4	
Aspect	2 2 2	2 2 2		2 2 2	2 2 2	
Texture	2 2 2	2 2 2		2 2 2	2 2 2	
Ensemble	16 16 17	14 12 13		15 15 15	17 16 16	

Les chiffres du tableau V nous montrent que l'influence du lavage de la crème sur la qualité du beurre est moins appréciable dans cette expérience que dans les précédentes. Dans l'expérience III, le beurre de crème non lavée est même un peu meilleur que le beurre de crème lavée. Dans l'expérience IV, le beurre de crème lavée n'est que de quelques points supérieur.

Nous ne pouvons nous expliquer ce résultat surprenant. Une troisième expérience, que nous n'indiquerons pas ici en détail, portant sur de la crème conservée froide, donna le même résultat.

Le lavage de la crème a eu cependant, même dans les cas ci-dessus, une influence favorable sur la décomposition de la graisse dans le beurre. C'est ce que montre le tableau V. Les enzymes décomposant la graisse ont été manifestement éloignées de la crème par le lavage, puisque la décomposition de la graisse dans le beurre de crème lavée est bien moins importante.

TABLEAU V.
ACIDITÉ DE LA GRAISSE DANS LE BEURRE
DE CRÈME NON LAVÉE ET DE CRÈME LAVÉE,

Expérience III			Expérience IV		
Jours	Acidité de la graisse dans le beurre de crème		Jours	Acidité de la graisse dans le beurre de crème	
	non lavée	lavée		non lavée	lavée
7	3,70	2,11	5	1,93	1,07
20	11,67	4,07	13	3,98	2,38
27	13,28	4,03	26	5,89	2,83
34	16,75	4,25	33	6	3,11
58	23,13	4,22	40	6,16	3,45
64	25,84	4,73	63	7,87	3,81
			69	8,40	3,43

Expériences V à XII. — Les expériences précédentes ne laissent aucun doute sur l'amélioration du goût et de la qualité du beurre obtenus en lavant trois fois la crème à l'eau et ensuite une fois au lait écrémé. Le fait que le lavage à l'eau doit avoir lieu plusieurs fois (2 fois au moins) avant de passer au lavage au lait écrémé, est montré par les 8 expériences suivantes qui prouvent qu'un seul lavage de la crème dans 5 fois son volume d'eau, à la température de 20-30°, est loin d'avoir, sur la qualité du beurre, une influence aussi favorable que deux à trois lavages successifs. L'acidité de la crème a été également, dans ces expériences portant sur un seul lavage, abaissée respectivement de 19°6 et 32°3 S. H. à 3°6 et 5°3 S. H. Les coefficients du beurre dans les 8 expériences montrent les différences suivantes :

	frais	10 jours après
Beurre de crème non lavée	16-18	11-16
Beurre de crème lavée	15-19	13-17

Le beurre de crème lavée une fois n'est donc supérieur que de peu.

Dans ces expériences, l'eau de lavage a été soumise à un examen. Elle contenait toujours un peu de graisse, car dans les 8 expériences, la proportion de graisse variait entre 0,05 et 0,62 %. Dans un cas, elle s'élevait même, pour une cause inexplicquée, à 1 %. Le tableau VI indique les chiffres concernant l'acidité et la proportion des acides gras volatils dans l'eau de lavage :

TABLEAU VI.
ACIDITÉ DE LA PREMIÈRE EAU DE LAVAGE
ET PROPORTION DES ACIDES GRAS VOLATILS.

Expérience n°	Température de lavage en degrés centigrades	Degré d'acidité	Acides gras volatils distillés sur 200 cm ³
V.....	20	2,5	5,1
VI.....	20	3,36	7,70
VII.....	20	4,30	9,60
VIII.....	20	3,80	13,25
IX.....	20	4,40	9
X.....	30	3,40	6,85
XI.....	30	3,70	7,45
XII.....	30	3,60	9,70

Ces chiffres montrent nettement que le premier lavage éloigne déjà de la crème une importante quantité d'acides et témoigne par là de la valeur du procédé. L'acidité de la graisse dans le beurre de crème lavée une fois et de la crème non lavée sont indiquées au tableau VII :

TABLEAU VII.
ACIDITÉ DE LA GRAISSE DANS LE BEURRE DE CRÈME LAVÉE UNE FOIS,

Expérience n°	Acidité de la graisse dans le beurre de crème :			
	non lavée		lavée	
	fraîche	de 10 jours	fraîche	de 10 jours
V.....	0,70	2,28	1,02	2,39
VI.....	0,65	2,41	0,60	1,55
VII.....	1,02	5,51	0,92	3,77
VIII.....	0,82	1,94	1,02	3,06
IX.....	1,02	6,49	1,10	2,53
X.....	1,02	5,51	1	2,65
XI.....	0,82	1,94	1,02	3,98
XII.....	1,02	6,49	1,26	2,94

Les chiffres de ce tableau montrent de nouveau à l'évidence que, même dans le beurre de crème lavée une seule fois, la décomposition de la graisse est moins élevée que dans le contrôle correspondant.

Expérience avec la crème de sérum de fromagerie. — Dans cette expérience, on a utilisé de la crème de sérum recueillie pendant une semaine et conservée dans une chambre froide.

La quantité s'élevait à la fin à 80 litres, dont il fut fait deux parts. La première, soit 40 litres, ne subit aucun traitement préalable. La seconde fut délayée 2 fois dans 200 litres d'eau chaque fois, lavée, centrifugée, puis délayée et centrifugée une troisième fois avec 200 litres de lait écrémé.

La première eau de lavage contenait 0,8 %, la seconde 0,05 %.

de graisse. Le petit-lait mélangé de lait écrémé contenait après la dernière centrifugation 0,37 % de graisse.

Le procédé du lavage amène donc certainement une légère diminution de la quantité de beurre produite, car la centrifugation répétée fait perdre chaque fois une certaine quantité de graisse.

Le tableau VIII contient les coefficients affectés dans cette expérience aux beurres de crème lavée et de crème non lavée. Le tableau IX indique la réaction de l'acidité de la graisse dans le beurre.

TABLEAU VIII.

COEFFICIENTS DU BEURRE DE CRÈME DE PETIT-LAIT NON LAVÉE ET LAVÉE.

Juges	non lavée			lavée		
	G. V. B.			G. V. B.		
Goût	6	6	5	8	8	8
Odeur	1	1	1	2	1	2
Fabrication	4	4	4	4	4	4
Aspect	2	2	2	2	2	2
Texture	2	2	2	2	2	2
Ensemble.....	15	15	14	18	17	18

TABLEAU IX.

ACIDITÉ DE LA GRAISSE DANS LE BEURRE DE CRÈME DE PETIT-LAIT LAVÉE ET NON LAVÉE,

Nombre de jours après l'obtention	Acidité de la graisse dans le beurre de crème	
	non lavée	lavée
2	2,13	2,39
9	2,54	2,28
16	2,92	2,35
40	6,83	2,29
46	8,14	2,79
55	12,69	4,51

Les chiffres des tableaux VIII et IX montrent nettement que le lavage de la crème de petit-lait permet d'obtenir un beurre meilleur et plus riche que celui de crème non lavée. A la fois comme goût et comme odeur, ce beurre a été trouvé supérieur par tous les juges. Ce résultat a d'ailleurs été souvent constaté dans la pratique, ainsi que me l'ont dit des propriétaires de laiteries et de fromageries. L'élévation de la qualité du beurre compenserait la perte de quantité.

POSSIBILITÉS DE DÉVELOPPEMENT DU PROCÉDÉ

Le procédé du lavage de la crème peut être encore perfectionné sous divers rapports. Certaines indications doivent être données à ce sujet. Pour neutraliser les acides et les enlever complètement, nous pouvons dissoudre dans la première eau de lavage une base telle que le bicarbonate de soude, le phosphate trisodique, le lait de chaux ou

l'un des produits neutralisants que l'on trouve dans le commerce sous différents noms, par exemple le « Wyandotte C. A. S. », qui est un produit éprouvé. La seconde eau de lavage doit être pure, libre de germes, et si possible stérilisée. On peut encore y dissoudre un peu d'acide citrique et de sucre de lait. On sait, d'après les recherches récentes, que certains parfums et certains goûts apparaissent dans la crème mûrie à l'acide citrique sous l'action de certaines bactéries lactiques, telles que le *Strept. citrovorus* de HAMMER et les betacoques d'ORLA-JENSEN. Un nouveau progrès vers la disparition complète des goûts et odeurs indésirables doit être atteint en faisant passer dans la crème, après adjonction de la seconde eau de lavage, un produit dégaisifiant, qui donne, comme on le sait, d'excellents résultats, particulièrement à l'époque de la nourriture avec les raves. Pour le lavage de la crème de petit-lait, il est peut-être encore plus avantageux d'employer du bon lait complet au lieu du lait écrémé.

M. J. CSISZAR, diplômé d'Agriculture, adjoint scientifique à l'Institut de Recherches, a pris part aux expériences ci-dessus.

RÉSUMÉ

En une série d'expériences, il a été démontré que la crème de lait et de sérum de fromagerie était améliorée par des lavages répétés à l'eau et au lait écrémé et qu'elle donnait un beurre meilleur et plus riche. Des indications complémentaires seront données par la suite sur les perfectionnements éventuels du procédé.

RECHERCHE ET NUMÉRATION DU COLI-BACILLE DANS LE LAIT PAR LA MÉTHODE DU ROUGE NEUTRE par THÉODOR VASSILEFF

Docteur-Vétérinaire.

(Travail du Laboratoire d'Hygiène de la Faculté de Médecine et du Laboratoire des Industries animales de l'Ecole vétérinaire de Lyon.)

INTRODUCTION

LES SOURCES DE CONTAMINATION DU LAIT

Par sa composition chimique, par sa réaction, par la lenteur de son refroidissement, le lait, si on ne prend pas la précaution d'abaisser fortement sa température après sa récolte, constitue, pour les nombreux microbes qu'une traite malpropre y aura déversés, un excellent milieu de culture, et, malgré la phase « bactéricide » qui commence et se poursuit quelques heures après la mulsion, la plupart des germes qui l'ontensemencé y pullulent bientôt.

Les sources de contamination du lait sont nombreuses :

1° Le lait peut tout d'abord être *infecté dans la mamelle même*, soit *par voie centrifuge*, l'infection étant d'origine sanguine (tuberculose, fièvre aphteuse, fièvre méditerranéenne, etc.), soit *par voie centripète*, l'infection étant d'origine externe (mammites à streptocoques, par exemple) ;

2° Le lait peut être souillé, dès son contact avec l'extérieur, par des microbes de provenances diverses. La contamination : a) est le fait de l'homme : diphtérie, scarlatine, typhoïde, rougeole, choléra ; b) elle vient de l'animal par ses excréments, sa microflore cutanée, ses écoulements vaginaux ; c) elle résulte du milieu : poussières du sol, du fourrage, etc.

PARKER résume, dans le tableau suivant, ces diverses sources de contamination :

1° *La vache*. — Pis ; fèces et urines ; écoulements de la bouche et du nez ; peau et annexes.

2° *Le milieu*. — Air, plafond, planchers, bat-flanc, nourriture, fourrage, litière, ustensiles, seaux, eau et glace.

3° *L'homme*. — Ecoulement du nez et des oreilles ; fèces et urines ; peau et vêtements.

4° *Les parasites*. — Les mouches.

Les diverses espèces pathogènes que le lait peut contenir étant laissées de côté, les bactériologistes ont choisi, pour déceler la *contamination indésirable par les matières fécales* du lait comme de l'eau, certains « tests » dont la valeur et la signification paraissent indiscutables.

Les recherches du *Bacterium coli*, du *Bacillus lactis aerogenes*, du *Bacillus enteritidis sporogenes* et de certains streptocoques sont celles qui ont été le plus communément choisies par les hygiénistes de différents pays pour apprécier la contamination du lait par les matières fécales.

LE COLI-BACILLE

Le coli-bacille a été isolé par ESCHERICH (1885) des matières fécales du nouveau-né. On l'a rapidement trouvé dans l'intestin de l'homme et des animaux, dans le gros intestin surtout, où il est constamment présent, d'où ses noms de *coli-bacille*, *Bacterium coli*, *Bacillus coli communis*.

Si le bacille d'Eberth et les Paratyphiques constituent des espèces bien différenciées, l'espèce coli-bacille n'a pas de limites bien tranchées. Il y a, en réalité, un groupe de races bacillaires qu'on appelle *Coli-bacilles*. Dans ce groupe sont rangés une foule de bacilles très voisins, mais non absolument identiques. On a créé pour eux le nom de *Paracoli-bacilles*.

A. — ISOLEMENT. CULTURES

1° Isolement. — On emploie les mêmes procédés que pour l'Eberth. Il suffit de cultiver une parcelle de matière fécale quelconque.

2° Caractères généraux des cultures. — Ce sont ceux que donne le bacille d'Eberth, mais la végétation est un peu plus rapide et plus abondante. Odeur urineuse. Le coli-bacille végète dans les milieux solides où ont déjà végété des colonies de bacille d'Eberth qu'on a enlevées par grattage (CHANTEMESSE et WIDAL).

3° Cultures sur milieux solides. — Identiques à celles du bacille d'Eberth sur les milieux ordinaires, *sauf sur la pomme de terre, où la culture est habituellement épaisse, luisante, brunâtre.*

a) Gelose lactosé tournesolé : vire nettement au rouge, avec dislocation du milieu par les gaz produits.

b) Gelose tournesolée, additionnée de glucose, de lévulose, de galactose, de maltose ou de mannite : virage au rouge, avec dislocation du milieu.

c) Gelose au rouge neutre : vire au jaune canari, avec fluorescence verte, comme le paratyphique.

d) Gelose au sous-acétate de plomb : ne noircit pas ; il y a quelques exceptions à noter.

e) Gelose de Drigalski-Conradi, d'Endo : donne sur ces milieux des colonies rouges.

4° Cultures en milieux liquides.

a) Bouillon : comme le B. d'Eberth.

b) Bouillon lactosé et tournesolé : fait virer rapidement au rouge. Cette réaction est capitale.

c) Bouillon lactosé et carbonaté : dégagement gazeux. Il en est de même pour les bouillons levulosés, galactosés, maltosés, mannités, etc.

d) Bouillon au rouge neutre : vire au jaune canari, avec fluorescence verte, tandis que le B. d'Eberth le laisse rouge.

e) Lait : Coagulation en 24 heures. Réaction capitale. Le coagulum est surmonté d'un liquide jaunâtre ; parfois la coagulation est totale.

f) Petit lait tournesolé : vire au rouge. Acidité considérable.

B. — COLORATION. CARACTÈRES MICROSCOPIQUES

On trouvera dans les ouvrages classiques de bactériologie toutes indications sur la coloration, la forme, la mobilité.

C. — CARACTÈRES BIOLOGIQUES

1° Habitat. — Il existe dans le tube intestinal de l'homme et des animaux, dès les premières heures qui suivent la naissance.

On le trouve dans l'eau, dans le sol, dans les poussières, partout, en un mot, où les souillures par les matières fécales ont pu pénétrer. *C'est un des microbes les plus répandus dans la nature.*

2° Flore intestinale. — TISSIER (1900) a spécialement étudié la flore des

nourrissons et décrit, à côté du coli-bacille, un anaérobie, le *B. bifidus*, qui est même prédominant lorsque le nourrisson est nourri au sein.

MASFZEN, NENCKI, M^{me} SIEBER (1900) ont montré que les microbes intestinaux sont surtout abondants dans le colon. C'est là où végètent tous les microbes nuisibles à la santé, d'après METCHNIKOFF.

3° Vitalité. — Elle est plus grande que celle du bacille typhique. Si on ensemente les deux microbes en même temps dans un même milieu, on ne trouve plus, au bout de quelques jours, que le coli-bacille.

4° Virulence. — *Sa virulence est des plus variables.* Isolé de l'homme sain, il est presque toujours peu virulent. Au contraire, il devient très virulent dans les états fébriles, dans beaucoup d'affections intestinales. Il l'est au maximum lorsqu'il est l'agent unique de la maladie.

On se procure facilement du coli-bacille virulent en suturant l'anus d'un cobaye. L'obstruction intestinale que l'on crée engendre de la péritonite, et le bacille qui est dans la sérosité louche du péritoine est très virulent.

5° Action sur les sucres. — *Le coli-bacille fait fermenter la plupart des sucres :* lactose, glucose, lévulose, galactose, maltose, mannite, glycérine (CHANTEMESSE, PERDRIX, WIDAL). Il se produit alors :

1° des gaz (hydrogène, acide carbonique, etc.) ;

2° des *acides* (lactique droit ou gauche, acétique, formique, butyrique, succinique).

Cette production double de gaz et d'acides est mise en évidence par les procédés de culture déjà connus (milieux lactosés et tournesolés ou additionnés de fuchsine, bouillon lactosé et carbonaté, lait).

6° Formation d'indol. — *Les coli-bacilles-types donnent toujours de l'indol.* Il faut, pour que la réaction ait toute sa valeur, s'assurer au préalable que la *peptone* utilisée n'en renferme pas.

REVUE GÉNÉRALE DES PRINCIPAUX PROCÉDÉS DE RECHERCHE DU *B. COLI*

On sait que l'analyse bactériologique qualitative de l'eau se réduit, la plupart du temps, à la recherche du coli-bacille. Ce microbe, hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux, se trouve dans l'eau, toutes les fois que cette dernière a été souillée par des matières fécales, du purin, du fumier, etc., et le nombre de coli-bacilles qu'on y décèle donne approximativement la mesure de la pollution.

La recherche de ce microbe est classique et facile, mais, quel que soit le procédé que l'on emploie, il faut toujours isoler le microbe et l'identifier, si l'on veut avoir le droit d'affirmer la présence du coli-bacille. Que l'on utilise les procédés de Chantemesse et Widal, de Péré ou de Vincent, le fait que des microbes végètent dans les milieux phéniqués utilisés par ces méthodes ne permet pas une affirmation précise : il faut isoler un échantillon microbien et l'identifier. Si l'on utilise la méthode au rouge neutre, suivant les indications de STOKES, BRAUN, etc., il en est de même. Il faut donc un certain temps pour avoir un résultat, d'autant plus que l'identification se complique

de la présence de coli-bacilles atypiques et de para coli-bacilles, dont le nombre est considérable.

1^o Procédés de différenciation par la température. — Ce procédé, très simple, a été indiqué par RODER, en 1889. Il utilise ce fait que, seuls ou à peu près, le coli-bacille et le bacille d'Eberth, parmi les microbes des selles ou des eaux, cultivent à la température de 45°.

On ensemence quelques ballons de bouillon, on les place 48 heures dans une étuve à +44°5. Au bout de ce temps, si les ballons sont troubles, il y a de fortes présomptions pour que l'on ait affaire à du coli-bacille.

2^o Milieux phéniqués. — Les différents procédés reposent sur une des propriétés fondamentales du coli-bacille.

a) *Procédé de Chantemesse et de Widal.* — On ajoute 4 à 5 gouttes d'une solution d'acide phénique à 1/20 par cm³ de gélatine ; on coule en tubes. On fait des cultures en boîtes de Pétri ou en tubes d'Esmarch. L'acide phénique fait une sélection ; la plupart des microbes autres que le *B. d'Eberth* et le *coli-bacille* ne végètent pas.

b) *Procédé de Vincent (1890).* — C'est le procédé de choix. VINCENT a combiné l'acide phénique et l'action de la température.

Voici la technique définitive de cet auteur :

1^o Dans cinq tubes contenant chacun 10 cm³ d'eau peptonée (1 %) et salé (0,5 %), on verse successivement, et à l'aide d'une pipette jaugeant par exemple XX gouttes au cm³ : I goutte, II gouttes, V, X, XX gouttes à analyser.

2^o Dans deux autres tubes, plus larges, et renfermant chacun 20 cm³ d'eau peptonée, on verse 2 cm³ et 5 cm³ de la même eau.

3^o Dans cinq petits ballons ou fioles de Vivien stérilisés, on verse successivement 10 cm³, 20, 50, 100 et, au besoin, 200 cm³ d'eau à analyser (on peut utiliser les flacons eux-mêmes dans lesquels l'eau a été expédiée). Pour l'ensemencement de ces très grandes quantités d'eau, il est plus simple d'enrichir directement chaque dose d'eau en lui ajoutant une certaine quantité de solution peptonée et salée concentrée.

VINCENT emploie la solution stérilisée suivante, qui est parfois un peu trouble, mais qu'il est inutile de filtrer :

Peptone sèche de Witte	50 gr.
NaCl	25 gr.
Eau distillée	100 gr.

Le mélange de milieu nutritif concentré et d'eau à analyser doit être tel que le taux de la peptone qu'il renferme soit égal à environ 1 %.

Par exemple, dans le ballon ayant reçu 50 cm³ d'eau, on ajoutera 1 cm³ de la solution mère nutritive.

Pour permettre l'isolement du coli-bacille, ce mélange doit être additionné d'acide phénique, destiné à limiter la multiplication des autres bactéries.

Pratiquement, on obtient un titre phéniqué convenable en laissant tomber, à l'aide d'une pipette jaugeant environ XXX gouttes au cm^3 , une goutte de solution phéniquée à 5 % pour 2 cm^3 de mélange d'eau et de solution peptonée concentrée. Dans l'exemple ci-dessus (50 cm^3), il faudra ajouter XXV gouttes de solution phéniquée.

Etiqueter, agiter et mettre à l'étuve, réglée à 41°5, tous les tubes et ballons ainsi ensemencés.

Si tous les tubes et ballons examinés le lendemain matin sont restés clairs ou s'ils sont à peine louches, on peut conclure que l'eau aux doses ensemencées ne renferme pas de coli-bacille. Ce dernier microbe trouble, en effet, très nettement le bouillon phéniqué, à l'encontre de quelques bactéries qui peuvent exceptionnellement pousser dans ce milieu, à cette température.

Lorsque la culture en bouillon phéniqué et à 41°5 est nettement troublée, on réensemence en bouillon simple, ceux des tubes ou ballons qui se sont ainsi troublés. S'il s'agit du coli-bacille, sa rapidité de multiplication est telle que, dès 4 à 5 heures après, ce réensemencement donne une culture déjà évidente, et qui commence à présenter ses ondes soyeuses. On l'examine à l'état frais et on l'identifie par les moyens ordinaires.

Le dénombrement des coli-bacilles se fait facilement comme il suit : Supposons, par exemple, que les tubes ensemencés avec I, II et V gouttes d'eau soient restés clairs et que le tube ayant reçu X gouttes ($\frac{1}{2} \text{ cm}^3$), ainsi que les suivants, aient été troublés par le *B. coli* : on en conclut qu'il existe un exemplaire de ce dernier microbe dans $\frac{1}{2} \text{ cm}^3$, soit 2.000 par litre.

c) *Procédé de Péré* (1891). — PÉRÉ se sert aussi de l'acide phénique ; mais au lieu d'ensemencer l'eau en petites quantités dans un bouillon phéniqué, il transforme un certain volume d'eau en un milieu nutritif et phéniqué. De cette façon, le coli-bacille et le *B. d'Eberth* ne peuvent échapper.

On met dans un matras stérilisé d'un litre : 150 cm^3 de bouillon peptoné, 6 à 700 cm^3 d'eau à analyser, et 20 cm^3 d'une solution phéniquée à 5 %.

On répartit le tout dans 10 ballons stérilisés et on porte ceux-ci à une température qui peut varier entre + 32° et + 36° (à + 34° en moyenne). Le trouble ne se produira pas ou se produira d'autant plus rapidement que la pollution est plus forte (douze à trente heures). Dès que le trouble est évident, on prélève de la semence pour fertiliser du bouillon normal et du bouillon phéniqué. On fait ainsi trois passages en bouillon phéniqué pour avoir le coli-bacille à l'état de pureté, car les autres espèces disparaissent pendant ces passages.

3° Milieux lactosés. — Le lactose a été choisi pour la recherche du *B. coli* dans le lait, à la place du glucose, parce qu'il existe dans le lait d'autres microbes que le *B. coli* qui font fermenter le glucose avec production de gaz.

a) *Procédé de Race.* — Pour l'examen du lait en vue de la recherche du coli-bacille, J. RACE recommande un milieu contenant :

0 gr. 8 % de lactose ;

3 à 4 gr. % de peptone ;

0 gr. 6 % de chlorure de potassium et de réaction légèrement acide.

On fait avec le lait expertisé des dilutions telles que les quantitésensemencées soient de 0 cm³ 001, 0 cm³ 01, 0 cm³ 1, etc. La culture des tubes contenant des gaz est repiquée pour identification sur milieux solides (Rebipelagar), mais dans la pratique, et si l'on s'est servi de tubes à fermentation, on pourra se contenter de considérer comme positifs les tubes montrant plus de 5 % de gaz dans la branche fermée du tube.

b) *Méthode Steward*. — Dans les essais de présomption pour déceler le *B. coli* dans l'eau et le lait, Anglais et Américains emploient beaucoup le bouillon de bile lactosé (L. B. B.), dont le principe remonte à JACKSON et MUER (1906), et qui est aussi à la base de la méthode française Gryscz et Pierret.

Le milieu L. B. B. se prépare en ajoutant 1 gr. % de peptone et 1 gr. % de lactose et de la bile de bœuf fraîche.

Les tubes contenant du *B. coli* montrent le plus souvent des gaz au bout de 48 heures, mais il est bon d'aller jusqu'à 72 heures.

RACE reproche à cette méthode d'empêcher la croissance de nombreuses variétés, qu'il estime encore vigoureuses, du *B. coli* ; pour éviter ce reproche, on doit faire des dilutions telles que la méthode n'est plus pratique.

c) *Méthode au violet de gentiane*. — Joan C. HALL et Lillian Jordan ELLEFSON, de l'Université de Californie, montrant, après CREEL (1914), que beaucoup d'anaérobies donnant des spores, contenus dans l'eau et dans le lait, peuvent donner des gaz aux dépens du lactose, et venir ainsi fausser les essais de présomption pour le *B. coli*, veulent éliminer ces organismes en ajoutant au bouillon lactosé du violet de gentiane dans la proportion de 1 pour 100.000 à 1 pour 20.000. Les cultures de tous les tubes montrant une bulle de gaz ou plus sont repiquées sur gélose lactosée-tournesolée, contenant 1 pour 100.000 de violet de gentiane.

Cette méthode élimine la plupart des aérobies faisant fermenter le lactose et beaucoup d'aérobies ou anaérobies prenant le Gram et ayant la même action sur ce sucre. Elle restreint ainsi le champ d'investigations du *B. coli*.

Si l'on veut l'appliquer au lait, ces auteurs recommandent d'ensemencer dans 20 cm³ de bouillon, 1 cm³ de lait au lieu de 10 cm³ d'eau.

Elle élimine du lait les cocci qui font fermenter le lactose avec gaz et la plupart des streptocoques producteurs d'acide, formant des colonies rouges sur gélose lactosée-tournesolée.

d) *Gélose minérale lactosé de Kufferath*. — C'est un bon milieu d'isolement du coli-bacille, pour le lait comme pour l'eau. Il y pousse abondamment, en colonies crémeuses caractéristiques, alors que les autres germes (certains staphylocoques des eaux et du lait) s'y développent, mal, mais il y meurt bientôt. Le *B. coli* y affecte une forme allongée en huit caractéristique.

On prépare ce milieu de la façon suivante :

Faire une solution minérale avec :

Eau distillée	200 cm ³
Phosphate bipotassique	1 gr. 5
Nitrate d'ammonium	20 gr.
Carbonate de sodium	2 gr.
Sulfate de sodium	2 gr.
Sulfate de magnésium	3 gr.
Sulfate de potassium	0 gr. 5

Bien l'agiter, en prélevant 50 cm³, et y ajouter :

Eau de ville	950 cm ³
Lactose	15 gr.
Gélose	15 gr.

Passer à l'autoclave pour fondre la gélose. Répartir en tubes ; stériliser à 120° pendant 20 minutes.

e) *Méthode Pegallac.* — Dans nombre de laboratoires en Hollande, en vue de déterminer la présence éventuelle d'organismes du groupe *Coli* dans le lait pasteurisé ou dans 1/10 de cm³ de lait spécial, dit modèle, on a recours à la méthode dite « Pegallac ».

Une solution aqueuse contenant 1 % de peptone, ½ % de lactose, 3 % de bile de bœuf, stérilisée par maintien pendant ¼ d'heure à la température de 100° C., est additionnée de 3 % d'une solution de tournesol. Des fractions de 15 cm³ de cette préparation sont stérilisées dans des tubes, par maintien pendant ½ heure à la température de 100° C. Pour déterminer la présence de coli-bacilles dans le lait, on additionne 1 cm³ de lait au contenu d'un des tubes, on met le mélange dans un tube à fermentation et on le place pendant 24 heures à la température de 37° C. Si la couleur devient rose ou blanche et qu'il y ait développement de gaz, on considère qu'il y a présence d'organismes du groupe *coli*.

LERNER examina 998 échantillons de lait pasteurisé et 24 échantillons de lait modèle, non seulement par la méthode Pegallac, mais encore par d'autres méthodes, en vue d'y déterminer la présence d'organismes du groupe *Coli*, c'est-à-dire coagulant le lait, formant de l'indol, réduisant le rouge neutre et produisant du gaz dans des solutions aqueuses de glucose-peptone et de lactose-peptone, caractères que doit posséder un organisme pour que, d'après LERNER, il puisse être considéré du groupe *Coli*.

LERNER appliqua au lait la réaction de l'indol préconisée par GERSBACH, pour déterminer la présence d'organismes du groupe *Coli* dans l'eau.

Il prépara une solution aqueuse, dont un litre contenait 10 gr. de peptone, 10 gr. de chlorure de sodium et 250 mgr. de bicarbonate de soude. 1 cm³ de lait fut additionné à 9 cm³ de la solution ; de cette dilution à 1/10, 1 cm³ fut additionné à 9 cm³ de la solution, et ainsi de suite, de façon à obtenir des dilutions de 1/10.

1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 du lait dans la solution. Après maintien à 37° C. pendant 24 heures, la présence éventuelle d'indol fut décelée avec le réactif d'Ehrlich (paradiméthylaminobenzaldéhyde : 2 gr., alcool à 96 % : 190 cm³, et HCl à 25 % : 40 cm³).

Généralement, il n'y eut pas la réaction de l'indol avec la dilution au 1/10, même en présence de coli-bacilles. C'est que, probablement, il y eut inhibition de son développement, pour laquelle LERNER implique, soit la coagulation du lait, soit la présence de lactose. Mais, toujours, lorsqu'il y eut réaction de l'indol, la présence d'organismes du groupe *Coli* fut également constatée par cultures dans du bouillon acide, sur plaques d'agar, d'Endo, etc.

LERNER est d'avis que la réaction de l'indol doit être négative pour du lait « modèle » et du lait pasteurisé à la dilution de 1/100, que pour du lait ordinaire, elle est presque toujours positive à la dilution de 1/100, parfois encore à celle de 1/1.000 ; qu'elle est encore positive pour des laits de mauvaise qualité, récoltés dans de mauvaises conditions, à des dilutions de 1/1.000 et encore souvent de 1/100.000.

LERNER émet la conclusion que la réaction de l'indol, appliquée comme il le prescrit, permet de décider en 24 heures de temps, si du lait dit « modèle » a été récolté dans les conditions de propreté requises, et si du lait pasteurisé a été chauffé à une température suffisamment élevée, pendant un espace de temps suffisamment long.

f) *Gélose de Drigalski-Conradi au Krystall-violet*. — Ce milieu se prépare au moyen des quatre solutions suivantes :

Solution N° 1. — Faire macérer 1.500 gr. de viande de bœuf, à froid, pendant 10 heures, dans deux litres d'eau. Coction d'une heure et filtration.

Ajouter le mélange suivant :

Peptone de Witte	20 gr.
Nutrose (c'est un caséinate alcalin)	20 gr.
Sel marin	10 gr.

Nouvelle coction d'une heure, filtration et addition de 60 gr. de gélose. Séjour à l'autoclave pendant une heure ; alcaliniser légèrement, filtrer, faire bouillir pendant une demi-heure.

Solution N° 2. — Dissoudre 3 gr. de lactose dans 300 cm³ de teinture de tournesol. Faire bouillir pendant 10 minutes.

Ajouter à la solution N° 1, encore chaude et liquide, la solution N° 2 lactosée et tournesolée.

Solution N° 3. — Solution de soude à 10 % stérilisée, et ajoutée au mélange précédent, dans la proportion d'au moins 4 cm³.

Solution N° 4. — Ajouter enfin 20 cm³ d'une solution de Krystall-violet à 0 gr. 10 pour 100 cm³ d'eau distillée. Couler en tubes ou en boîtes de Petri.

Le bacille d'Eberth et les bacilles paratyphiques donnent des colonies incolores ; celle du coli-bacille sont rouges. Le Krystall-violet

aurait l'avantage d'empêcher le développement des germes associés aux bacilles typhiques et paratyphiques et au coli-bacille.

g) *Gélose fuchsiné d'Endo*. — La gélose fuchsinée, additionnée de sulfate de sodium, est décolorée. Les acides sécrétés par le coli-bacille recolorent (colonies rouges en vingt-quatre heures), les colonies de B. d'Eberth restent incolores.

Ce milieu se prépare au moyen suivant :

Dissoudre 30 gr. de gélose dans un litre de bouillon. Filtrer. Neutraliser. Ajouter 10 cm³ de solution de bicarbonate de soude à 10 %, 10 gr. de lactose et 5 cm³ de solution saturée et filtrée de fuchsine. Ajouter 25 cm³ de solution récente de sulfate de sodium (10 %). Stériliser à + 115°.

C'est le meilleur milieu pour la recherche dans les selles ; mais il est de préparation délicate.

h) *Gélose métachrome jaune de Gassner*. — Pour 1.000 cm³ d'agar de culture chaude, on ajoute 62 cm³ 5 d'une solution aqueuse de métachrome jaune (II R. D.) qui a bouilli pendant 2 minutes.

On dissout dans 87 cm³ 5 d'une solution aqueuse à 1 % de Wasserblau (6 B. extra P. de *Agfa*), 50 gr. de lactose et l'on porte à l'ébullition pendant 10 minutes. Cette solution est ajoutée à l'agar de culture chaude, qui a été traité par le métachrome jaune ; bien mélanger, verser dans un flacon d'Erlenmeyer de 200 cm³.

Prélever le germe.

L'ébullition des diverses solutions de coloration se fait séparément pour éviter la précipitation.

i) *Agar au bleu de Chine et au vert malachite (Bitter)*. — On porte à l'ébullition pendant quelques minutes 1.000 cm³ d'agar de culture additionnés de 20 gr. de lactose. A 100 cm³ d'agar chaud, on ajoute 9 gouttes d'une solution aqueuse de bleu de Chine (Höchst) et 2 cm³ 5 d'une solution de vert malachite à 0,1 % (Krist. extra Höcbst). Verser dans un flacon une quantité déterminée. Après culture, effectuer la recherche et le prélèvement des germes.

4° *Milieux à l'esculine*. — L'esculine est un glucoside, extrait du marron d'Inde. Sous l'influence de certains ferments, il se dédouble en glucose et en esculetine, diphénol complexe, qui, en présence de citrate ferrique, produit une coloration brune ou noirâtre selon la réaction du milieu. L'addition de glucose au milieu empêche la réaction.

C'est sur cette réaction qu'est basé l'emploi du milieu à l'esculine pour déceler le coli-bacille. Cette bactérie, ainsi que le *bacillus lactis aerogenes* (très voisin et ayant la même signification) provoquerait la fermentation de l'esculine, laquelle, en présence du sel de fer, donne la coloration noire.

Deux milieux peuvent être employés, le milieu liquide et le milieu solide.

HARRISON et VAN DER LECK proposent un milieu ayant la composition suivante :

Peptone de Witte	1 %
Sels biliaires	2,5
Esculine	1
Citrate de fer	0,05
Eau	100 cm ³

Quant au milieu solide, il est ainsi préparé :

Dissoudre dans 100 cm³ d'eau : 1 gr. de peptone de Witte, 0 gr. 25 de sels biliaires, 1 gr. 50 à 2 gr. de gélose.

Neutraliser avec un alcali.

Coaguler avec du blanc d'œuf et filtrer. Ajouter : 0 gr. 20 de citrate de fer, 0 gr. 10 d'esculine. Cette quantité doit donner une légère acidité et produire un peu de fluorescence au milieu.

Le milieu solide noircit de façon plus énergique que le milieu liquide. Autour des colonies surtout, on observe une teinte brune très foncée.

Des recherches effectuées par ROCHAIX sur l'eau et sur le lait, la réaction est en défaut dans la proportion du tiers des cas environ.

En somme, les milieux à l'esculine ne permettent pas d'obtenir avec le coli-bacille une réaction suffisamment constante, pour constituer un caractère biochimique de réelle valeur. Son emploi se montre très inférieur aux méthodes classiques.

5° Milieux au rouge neutre. — Principe. — Historique. — Manuel opératoire. — L'emploi du rouge neutre pour la recherche du coli-bacille dans les eaux a été préconisé en 1898 par ROTHBERGER.

En la même année, ROTHBERGER découvre la propriété du coli-bacille de faire virer la gélose colorée au rouge neutre au jaune canari avec fluorescence verte. Ce caractère est aujourd'hui classique ; on n'oublie jamais de le rechercher pour identifier le coli-bacille. En 1902, GÈZES, étudiant ce procédé sur diverses espèces de coli-bacille, fait la remarque importante que la température n'influe pas sur la réaction du rouge neutre, donnée par le coli-bacille. En 1904, STOKES s'applique à la recherche directe du coli-bacille dans les eaux. BRAUN, en 1906, se fait le défenseur ardent de cette méthode. LACOMME l'associe à la méthode d'Eijkmann en portant le milieu à la température de 45-46°, qui permet la végétation du coli-bacille et du bacille d'Eberth, en éliminant un grand nombre d'autres germes ne pouvant végéter à cette température.

Causes d'erreur. — De nombreux auteurs font remarquer que la réaction n'est pas spécifique et que beaucoup de microbes, autres que le coli-bacille, sont capables de donner une réaction positive.

ROTHBERGER signalait déjà, en 1898, que le bacille du tétanos et

celui de l'œdème malin peuvent donner une fluorescence verte sur les milieux au rouge neutre.

SCHEFFLER, en 1900, retire des matières fécales huit variétés de germes, et, des eaux, trois variétés pouvant rendre fluorescent le milieu au rouge neutre. HUNTER, en 1901, indique que le *Bacillus enteritidis* de Gaertner, le *B. tétanique* et le bacille du charbon donnent une réaction positive. SEGALE, en 1908, constate que certains paratyphiques font virer le rouge neutre. FERRERA, HORTA et PABEDS ont constaté le virage du rouge neutre avec le *bacillus cloacæ*.

ROCHAIX, en 1909, montre que le *Bacillus subtilis* donne une belle fluorescence verte, mais sans passage de la coloration rouge primitive au jaune canari.

SICRE, la même année, donne une liste de microbes faisant virer le rouge neutre : *B. pyocyannique*, *B. fluorescens putridis*, *B. paratyphique* B. (SCHOTMULLER, SACQUEPÉE), le *B. de Gaertner*, le *B. enteritidis*. Il remarque que ces germes ne donnent pas toujours avec une absolue netteté la teinte jaune canari. Il ajoute que le *B. mesentericus* et le *B. subtilis* donnent en bouillon au rouge neutre une teinte jaune pâle sans fluorescence, commençant à se produire dans les zones superficielles et ne gagnant que tardivement les zones profondes du liquide de culture.

VINCENT critique vivement la méthode pour la recherche du coli-bacille et assure que dans 5 % des cas avec des eauxensemencées en faible quantité (10 cm³), la fluorescence ou la teintejaune peuvent ne pas être dues au coli-bacille.

ROCHAIX et DUFOURT, en 1911, isolent d'urines et de purin six bacilles et deux microcoques qui donnent à la fois le jaune canari et la fluorescence verte.

Comme on le voit, le coli-bacille n'est pas le seul microbe donnant la réaction, et les critiques formulées plus haut ne tendent à rien moins qu'à dénier toute spécificité à cette réaction. Mais si parmi les faits avancés, il s'en trouve d'exacts, d'autres sont erronés ou observés d'une façon imprécise. La connaissance du mécanisme de la réaction et des conditions dans lesquelles elle doit être réalisée est nécessaire pour comprendre les faits et établir les distinctions nécessaires.

Mécanisme de la réaction. — Le mécanisme de la réaction du rouge neutre a été élucidé par les travaux de ROCHAIX et DUFOURT, d'une part, de GUERBET, d'autre part.

Le rouge neutre, très employé en teinture, est soluble dans l'eau, en lui communiquant une coloration rouge rubis.

Sous l'influence des alcalis, de l'ammoniaque en particulier, la base du rouge neutre est mise en liberté. Cette substance donne une coloration jaune orangé en solution aqueuse.

Si l'on fait agir sur le rouge neutre des réducteurs, tels que l'hydro-

gène naissant, *en solution acide*, le liquide devient rouge groseille, en même temps qu'apparaît une légère fluorescence verte, visible par réflexion.

En solution alcaline, les réducteurs transforment le rouge neutre, et le corps obtenu donne, en solution aqueuse, une *coloration jaune serin par transparence, avec fluorescence verte par réflexion*.

Il est d'ailleurs facile de produire cette réaction : on place dans un tube à essai 10 cm³ d'eau, additionnée de X gouttes de solution de rouge neutre à 25 %. On ajoute quelques parcelles de limaille de zinc et une dizaine de gouttes d'acide acétique ou lactique. Ce mélange est légèrement chauffé : un dégagement d'hydrogène apparaît. En continuant à chauffer, le dégagement devient régulier et abondant ; la coloration rouge, légèrement violacée, qu'a prise le rouge neutre sous l'influence de l'acidification, passe au rouge rubis, puis au rouge brique. On voit, en même temps, apparaître une fluorescence verte, qui va s'accroissant au fur et à mesure que la réduction se produit.

Sous l'influence de la réduction, un des deux éléments de la réaction, la fluorescence verte, est apparue. A ce moment, on décante la liqueur pour la séparer du zinc et on ajoute, goutte à goutte, un alcali, ammoniac ou potasse. La teinte rouge brique fait place à une teinte orangée puis à une teinte jaune canari, quand l'alcali est en excès.

En même temps, la fluorescence augmente, jusqu'à ce que l'excès d'alcali dissolve le précipité gélatineux d'oxyde de zinc. La fluorescence est exagérée par la présence du précipité gélatineux. (Dans les cultures, la présence des bactéries joue le rôle du précipité, en augmentant la fluorescence.)

La réaction est alors complète : *coloration jaune canari par transparence avec fluorescence verte par réflexion*. Elle est due, comme on l'a vu, à la réduction du rouge neutre en milieu alcalin.

Dans les cultures de coli-bacille en bouillon au rouge neutre, le mécanisme est le même.

Nous savons que le coli-bacille exerce une action réductrice puissante sur nombre de produits organiques : la chrysoïdine, la fuchsine, le vert brillant, le violet de gentiane, le bleu de méthylène, le tournesol, l'hydroquinone, l'orcéine, l'orseille, l'alizarine, le méthylorange. Le coli-bacille réduit le rouge neutre au même titre que les substances précédentes, et il possède vis-à-vis de cette substance une affinité particulière, alors que beaucoup d'autres bactéries, cependant réductrices, restent sans action sur elle.

Rôles des sucres dans la réaction. — Divers auteurs ont préconisé, les uns l'addition de glucose, les autres l'addition de lactose, dans le bouillon au rouge neutre. La présence de ces sucres permettrait la formation de gaz dans les cultures, sous l'influence de l'action fermentaire du coli-bacille et constituerait un caractère

diagnostique qui viendrait s'ajouter à celui tiré du virage du rouge neutre.

Mais la présence des sucres, si elle permet de surprendre la formation de gaz dans les cultures, gêne considérablement le virage du milieu au jaune canari avec fluorescence verte. SEGALÉ, de Gênes, en 1908, avait constaté que *l'acidité produite dans l'attaque du sucre par le coli-bacille empêche souvent la réaction*.

ROCHAIX a d'ailleurs vérifié le fait expérimentalement par une série de recherches du coli-bacille dans l'eau, comparativement en milieu au rouge neutre sucré (glycose ou lactose) et en milieux non sucrés. Les races à fonction acidogène accusée n'ont pas été décelées par le bouillon au rouge neutre sucré, alors que dans les bouillons non sucrés, on obtenait des résultats positifs. L'isolement des coli-bacilles de milieux phéniqués (procédé de Vincent) servait d'expérience-témoin.

La connaissance de tous ces faits nous permet maintenant de nous expliquer les résultats contradictoires obtenus par les bactériologistes cités précédemment.

Il est d'abord toute une catégorie de microbes qui ne donnent qu'un virage incomplet ; un seulement des deux éléments de la réaction : la fluorescence verte. C'est le cas du *B. tétanique*, du *B. de l'œdème malin*, du *B. pyocyane*, du *B. subtilis*, du *B. mesentericus vulgatus* ou *niger*, du *B. fluorescens*, et la liste pourrait être considérablement allongée. On ne peut pas dire qu'ils donnent une réaction positive.

D'autre part, tous les microbes capables de produire des *phénomènes de réduction en milieu alcalin* produiront le virage caractéristique avec ses deux éléments : fluorescence verte et coloration jaune canari.

C'est le cas du *coli-bacille*, des *paratyphiques A. et B.*, et des microbes qui se rattachent à ce dernier : *B. enteritidis* de Gaertner, *B. d'Aertryck*, du *Hogcholéra*, de la *Psittacose*, etc.

Il paraît donc acquis que la réaction du rouge neutre est l'apanage de microbes des matières fécales, du purin, du fumier, que le coli-bacille est loin d'être la seule espèce microbienne capable de donner la réaction complète, mais que *les autres espèces, donnant aussi la réaction positive, ont la même signification au point de vue de la contamination de l'eau*. (Dans son *Traité de Bactériologie*, t. II, p. 810, le Professeur MACÉ exprime déjà cette opinion.) Un échantillon d'eau ensemencé en bouillon au rouge neutre et donnant la réaction positive, sera considéré comme contaminé non pas seulement par le coli-bacille, mais par d'autres microbes provenant des matières d'origine intestinale. *L'indice de la contamination de l'eau ne sera plus le coli-bacille seul, mais l'ensemble des microbes faisant virer le rouge neutre*. Point ne sera besoin, dans ce cas, d'isoler le coli-bacille de l'eau pour affirmer la contamination : le virage complet du bouillon

au rouge neutre, à la suite de l'ensemencement d'un échantillon d'eau, suffira.

Procédés au rouge neutre

a) *Procédé de Rothberger* modifié par SAVAGE. — On fait bouillir 125 gr. de viande de bœuf dans 500 cm³ d'eau, et on ramène à 500 cm³. On filtre et on ajoute :

Peptone Dufresne	10 gr.
Sel marin	10 gr.
Glucose	2 gr. 60

On fait bouillir. On laisse refroidir. On ajoute 5 cm³ de solution aqueuse de rouge neutre à 5 %.

On stérilise à 115° pendant 30 minutes et répartit en tubes.

Le coli-bacille fait virer le milieu en 24 heures (48 heures au plus) au jaune canari avec fluorescence verte (bulles gazeuses), le B. d'Eberth ne modifie pas le rouge neutre.

b) *Procédé de Lacomme*. — Faire à chaud la solution de rouge neutre, filtrer, stériliser et conserver pour s'en servir à froid.

Bouillon :

Eau	1.000 gr.
Glucose	100 gr.
Peptone de Witte	100 gr.
NaCl	50 gr.

On répartit le bouillon en tubes de 15 cm³, auxquels on ajoute, au moment de les employer, 12 gouttes (pipette à 1/20 de centimètre cube) de la solution de rouge neutre.

c) *Procédé de Rochaix*. — Cet auteur a étudié le mécanisme de la réaction du rouge neutre et a montré que le virage au jaune canari et la fluorescence verte sont dus à des phénomènes de réduction en milieu alcalin. Or, la fermentation des sucres aboutit à la formation d'acides. Aussi, doit-on employer du bouillon au rouge neutre sans sucre. Le milieu à employer est le suivant :

Dans un demi-litre d'eau, on fait cuire 125 gr. de viande de bœuf. La cuisson ne doit pas être prolongée. Après refroidissement, on ajoute :

Peptone	10 gr.
Sel marin	10 gr.

On ramène à 500 cm³ avec de l'eau, on neutralise avec une solution de carbonate de soude jusqu'à neutralité ou alcalinité très légère. On stérilise à l'autoclave à + 120°, pendant un quart d'heure ; puis après refroidissement et repos, on décante avec précaution et on ajoute 5 cm³ de la solution suivante :

Rouge neutre	5 gr.
Eau distillée	100 cm ³

On porte à l'autoclave à + 115° pendant une demi-heure.

(A suivre.)