ne se présentent généralement pas simultanément, mais il semble tout à fait exceptionnel qu'ils manquent tous à la fois. Une attention spéciale devra s'attacher à l'indice catalasique.

En cas de doute, seule la contre-expertise à l'étable pourra éclairer la question, mais uniquement pour montrer si oui ou non on se trouve bien en présence d'un lait pathologique. Les variations rapides de la C. M. S. R. dans les laits pathologiques ne permettent pas d'aller plus loin, d'autant plus que, d'après les observations de CERF et les nôtres, il semblerait que les déficiences de la C. M. S. R. sont souvent de courte durée.

Les analyses que nous avons citées démontrent qu'on ne saurait être trop prudent quand il s'agit d'un lait pathologique. Ainsi, un prélèvement effectué sur le lait du 5 mai 1927, aurait certainement fait conclure au mouillage (C. M. S. R. : 51,34). Un prélèvement effectué le 29 mai, soit 24 jours plus tard, aurait donné une C. M. S. R. de 73,18, et aurait, aux yeux de l'expert, confirmé la suspicion du mouillage et l'expert n'aurait pas manqué d'ajouter que la C. M. S. R. ne s'abaisse jamais, même dans un lait anormal, voire pathologique, au-dessous de mettons : 69, et ainsi permet de distinguer un lait naturellement faible d'un lait mouillé, etc., et ce serait une erreur de plus.

Nous estimons donc, étant donné les faits que nous venons de rapporter, qu'en présence d'un lait *nettement* pathologique l'examen de la C. M. S. R. est insuffisant pour permettre d'affirmer le *mouillage*; tous les chiffres des analyses devront être confrontés et, dans la majorité des cas, dans la très grande majorité des cas, toute conclusion sera impossible.

SUR LA RECHERCHE DU *BACTERIUM COLI* DANS LE LAIT

par

JEAN PIEN

Ingénieur chimiste (I. C. R.)

Docteur ès sciences

Directeur des Laboratoires des « Fermiers Réunis »

et

JACQUES BACHIMONT et RENÉ FILHOL

du Laboratoire de Bactériologie des « Fermiers Réunis ».

(Suite.)

QUATRIÈME ARTICLE

Nous avons, dans notre précédent article, étudié l'influence de l'acide lactique libre sur le développement du *B. Coli*.

Conformément à notre plan, nous devons maintenant nous demander quelle est l'influence des corps microbiens des ferments lactiques sur la croissance du *B. Coli*, en l'absence d'acide lactique libre. Les résultats de ces recherches nous permettront, dans une certaine mesure, de prévoir l'influence des ferments lactiques travaillant normalement, c'est-à-dire libérant de l'acide lactique, avant même que de passer à l'expérimentation directe de ce cas pratique qui sera le couronnement de notre travail et nous mettra vraisemblablement sur la voie du mode opératoire cherché.

* * *

DEUXIÈME PARTIE

INFLUENCE DES CORPS MICROBIENS DES FERMENTS LACTIQUES VIVANTS SUR LE DÉVELOPPEMENT DU *B. COLI* EN L'ABSENCE D'ACIDE LACTIQUE LIBRE.

Nous avons montré précédemment que la numération du *coli*, pour l'étude de son développement, était impossible en présence de ferments lactiques. Or, pour juger de l'influence des corps microbiens des ferments lactiques sur le développement du *coli*, il faudrait, ici encore, pouvoir suivre ce développement par des numérations. Puisque la chose est matériellement impossible, nous userons d'un artifice inspiré par les conditions mêmes qui entourent la recherche du but poursuivi.

Emprisons-nous d'ajouter que la technique qui consisterait à mettre ensemble : lactiques et *coli* en quantités quelconques et à faire un repiquage après une incubation prolongée, serait sans intérêt pour deux raisons : d'abord parce que l'ignorance des quantités de germes en présence ne renseignerait pas pour la pratique ; ensuite parce que cette technique ne permettrait de juger que de la disparition totale du *coli* (si elle se produisait) ; car, si peu qu'il reste de *coli*, il pourrait être repiqué et on ne saurait pas ce qui s'est passé. D'ailleurs, nous ne cherchons pas à savoir s'il y a, oui ou non, destruction totale du *coli*, mais quelle est la marche de son développement ou de sa destruction éventuelle.

Nous savons, d'après un de nos précédents articles, que si un échantillon de 100 cm³ de lait par exemple contient de très petites quantités de *B. Coli* (de l'ordre de 1 germe), il faut faire incubé ce lait pendant 5 à 6 heures au moins à 37°, pour qu'un repiquage de 1 cm³ emporte avec certitude au moins un germe. Il s'agit en somme de savoir si ce qui est vrai pour du *coli* pur, l'est encore pour un mélange de *coli* et de lactiques dans des conditions telles que l'acidité lactique n'apparaisse pas et n'apporte aucune perturbation propre dans l'essai.

Le principe du mode opératoire apparaît donc ainsi :

Onensemencera du lait avec des ferments lactiques en quantité abondante et connue et du *B. Coli* en très petite quantité (de l'ordre de 10 germes au litre). Ce lait aura été préalablement traité de telle façon que sa réaction du début à la fin de l'expérience reste constante, c'est-à-dire qu'il n'apparaît pas d'acide lactique libre. Après 6 heures ou mieux 8 heures d'incubation, on repiquera *plusieurs fois* un centimètre cube dans des conditions qui seront exposées. Si tous ces repiquages sont positifs on en conclura que la prolifération du *coli* s'est produite en présence de lactiques, comme s'il avait été seul, ou du moins, ce qui nous importe surtout ici, que *cette prolifération a été suffisante pour le but poursuivi*.

Cette technique pose quelques problèmes délicats qu'il s'agit de résoudre d'abord :

§ 1. PROBLÈMES PRÉALABLES

Ces problèmes sont au nombre de trois :

- Maintien de la constance de la réaction pour empêcher la formation d'acide lactique.
- Détermination de la quantité de *B. Coli* à mettre en œuvre.
- Détermination de la quantité de ferments lactiques à mettre en œuvre.

1° MAINTIEN DE LA CONSTANCE DE LA RÉACTION AU COURS DE L'INCUBATION

La première idée qui vient à l'esprit est de faire appel au carbonate de calcium introduit dans le lait en réserve suffisante avant stérilisation et stérilisé avec lui. Nous avons expérimenté cette substance. Elle exige malheureusement des agitations très fréquentes, surtout à la fin de l'incubation, lorsque les ferments lactiques se sont abondamment multipliés. Dans les dernières heures, des agitations tous les quarts d'heure même sont insuffisantes et l'acidité monte rapidement pendant les repos. Pour une expérience rigoureuse, il conviendrait donc d'agiter sans arrêt, ce qui est difficilement compatible avec le séjour à l'étuve *et surtout avec l'asepsie du bouchage*.

Nous avons dû, après plusieurs essais infructueux, abandonner le carbonate de chaux.

Il fallait donc, pour parer à ces divers inconvénients, chercher une substance *soluble*, ne nécessitant que de légères et rares agitations, mais non susceptible en revanche, par la réserve constituée au départ, de donner au lait une alcalinité initiale qui eût faussé les conditions de l'essai. Le carbonate de soude (et à plus forte raison la soude) était donc à rejeter. Nous avons pensé au bicar-

bonate de soude. Mais une nouvelle difficulté s'est élevée, celle de la stérilisation. On sait que le bicarbonate de soude se dissocie en CO_2 et CO_3Na^2 fortement à partir de $70^\circ\text{--}80^\circ$. Dans la phase de chauffage à la pression atmosphérique qui précède, dans l'autoclave, la stérilisation proprement dite, on réalise précisément ces conditions. On observe que le lait est devenu riche en carbonate neutre, donc très alcalin comme on pouvait s'y attendre.

Différents essais ont alors été entrepris : stérilisation du lait additionné de bicarbonate en flacons hermétiquement cachetés, préalablement chargés en CO_2 pour augmenter la tension de ce gaz au-dessus du lait et diminuer d'autant la dissociation du bicarbonate ; stérilisation de lait bicarbonaté en tubes scellés presque complètement remplis pour diminuer le volume de CO_2 susceptible d'être produit et dépasser très rapidement la tension de dissociation du bicarbonate aux températures de stérilisation (ce qui limitait la décomposition). Ces essais nous ont permis d'obtenir du lait bicarbonaté stérile (20 minutes à 120°) où la décomposition du bicarbonate était nulle (même acidité avant et après stérilisation, absence de carbonates neutres). Mais la grande difficulté de ces expériences, d'ailleurs non exemptes de danger pour les opérateurs, nous les ont fait bientôt abandonner pour adopter définitivement une autre technique simple et élégante que nous recommandons aux chercheurs pour qui se poserait la nécessité d'obtenir du lait bicarbonaté stérile :

Dans un tube de verre de 35 à 40 cm. de long, de 8 mm. 5 de diamètre intérieur et 11 mm. 5 de diamètre extérieur, effilé sans le fermer à l'extrémité A, on introduit (en B) deux tampons de coton de 2 cm. de long environ, assez serrés. On réalise l'étranglement C.

Sur le coton on introduit 6 gr. de CO_3NaH en poudre très peu tassé et un témoin de contrôle de température pour 120° (on s'arrange pour que la chambre comprise entre le bicarbonate et le coton n'ait pas plus de 4 cm. de long); puis, après l'étranglement, un nouveau tampon de coton. On effile le tube en D sans le fermer.

Le tube étant ainsi chargé et ouvert aux deux extrémités, on le rince avec un courant de CO_2 pendant 10 minutes ; on mouille les cotons B en aspirant 1 à 2 cm^3 d'eau ; puis on ferme à la lampe les deux extrémités. Le tube terminé a 28 à 32 cm. de long.

On stérilise à 120° pendant 20 minutes sans précautions spéciales.

L'humidité contenue dans le tube permet de prévoir que la stérilisation se

fera à l'intérieur du tube *en milieu humide*. La présence de cette eau n'a pas seulement pour résultat d'assurer la stérilisation du sel, mais d'en empêcher la décomposition. En effet, la tension de vapeur maximum saturante de l'eau dans le tube à 120° (2 kilo ou 152 cm. de mercure) majorée, d'après la loi de Dalton, des 102 cm. de pression dus au chauffage du gaz confiné dans le tube, nous donne une pression totale de 254 cm., supérieur à la tension de dissociation du CO^3NaH à 120° qui est seulement de 200 cm. d'après Caven et Sand (*Journ. of the Chem. Soc.* 1911, p. 1359). La décomposition du bicarbonate ne peut donc pas se produire dans ces conditions.

La montre indicatrice de température introduite dans le tube permet de contrôler celle-ci.

L'opération d'ailleurs se montre, dans la pratique, parfaitement efficace : la température de 120° est bien atteinte, la petitesse de l'échantillon permet de supposer que l'équilibre de température a été atteint très rapidement ; des contrôles bactériologiques sur le sel montrent d'ailleurs qu'il a été stérilisé et des contrôles chimiques montrent qu'on a bien affaire à du bicarbonate ne contenant pas de carbonate neutre.

Cette dose de 6 gr. de CO^3NaH stérile est enfin introduite dans un litre de lait préalablement stérilisé et froid de la façon suivante : le tube est d'abord lavé extérieurement à l'alcool, la pointe D est cassée ; on adapte en D l'extrémité du tube de caoutchouc d'une soufflerie à main à deux poires ; on sectionne le tube en B entre les deux tampons de coton, on enlève aseptiquement le coton humide qui est au contact du bicarbonate, on présente le tube à l'entrée du flacon de lait, on chasse le bicarbonate par pression d'air en s'aidant au besoin de choes légers sur le tube.

La dose de 6 gr. de bicarbonate de soude a été choisie, car elle correspond à une réserve d'alcalinité en puissance capable de saturer 80° Dornic environ.

Bien entendu, le lait initial titrant 16°-17° Dornic, l'introduction de cette dose de bicarbonate a pour effet immédiat d'augmenter, comme on pouvait le prévoir, l'acidité du lait de quelques degrés Dornic — nouvelle preuve que notre bicarbonate est exempt de carbonate. Mais cette légère acidité supplémentaire ne doit pratiquement pas augmenter pendant l'incubation des ferments lactiques puisque l'acide lactique va être, au fur et à mesure de sa production, transformé en lactate de soude.

L'acide carbonique produit par la réaction augmente très légèrement l'acidité (mais sans jamais dépasser quelques degrés Dornic après 8 heures d'incubation et avec des quantités très importantes de ferments lactiques). En tout cas nous n'aurons jamais d'acide lactique libre dans le lait soumis à l'essai tant que la réserve de bicarbonate ne sera pas épuisée. On saura dans chaque cas si cette réserve est ou non épuisée, soit par le titrage de l'acidité du lait bicarbonaté qui ne doit presque pas augmenter, soit par le titrage de l'acidité d'un lait témoin non bicarbonaté et chargé de la même dose de ferments lactiques ; quand l'acidité de ce dernier atteint 80° Dornic, on peut admettre que la dose de bicarbonate de l'autre flacon est à peu près épuisée.

Nous avons donc le moyen de mettre à l'étuve un lait contenant des ferments lactiques sans voir apparaître d'acide lactique.

Une question se pose immédiatement qui ne nous a pas échappé. Ces substances : bicarbonate introduit, lactate formé, ont-elles

une influence propre sur la prolifération des ferments lactiques et surtout sur celle du *B. Coli* ?

Nous avons dû, de toute évidence, avant d'entreprendre nos expériences, résoudre ces problèmes particuliers. Nous épargnerons au lecteur le détail des techniques employées et des résultats obtenus. Ceux-ci se résument aisément en ceci : le lactate de soude ne gêne ni le *coli*, ni le ferment lactique ; le bicarbonate de soude (à 0,6 %) gêne un peu l'un et l'autre, mais d'une quantité qui est nettement au-dessous de celle qui pourrait constituer une gêne pour nos essais et pour leur interprétation. D'ailleurs, au cours de l'incubation, la quantité du bicarbonate présente diminue très vite. Il s'agit bien entendu, dans tous les cas, d'essais limités aux concentrations qui nous intéressent.

Donc, si dans un échantillon de lait bicarbonaté stérile, on met en présence du *B. Coli* et des ferments lactiques, ils agiront mutuellement comme si aucune substance étrangère n'était présente et surtout nous aurons la certitude qu'il n'apparaîtra pas d'acide lactique. Il est légitime de supposer, dans ces conditions, que l'influence des ferments lactiques sur le *B. Coli*, en l'absence d'acidité, pourra être mise en évidence.

2° QUANTITÉ DE *B. COLI* A METTRE EN ŒUVRE

Le but que nous poursuivons, et qu'il ne faut pas perdre de vue, est le suivant : pouvoir déceler de très faibles quantités de *B. Coli* dans un lait. L'ordre de grandeur de ces quantités, nous l'avons dit dans nos précédents articles, devrait pouvoir être de 20, 10 germes et même moins, au litre de lait, c'est-à-dire, absence ou présence d'au moins un germe de *coli* sur 50, 100 cm³ de lait ou plus. Les laits sortant des pasteurisateurs peuvent et doivent donner des résultats de cet ordre. Certains laits du commerce, même, les donnent.

Dans les expériences que nous avons entreprises, nous avons effectivement cherché à nous placer au maximum de sévérité, c'est-à-dire, à introduire dans un échantillon de un litre de lait des doses de *B. Coli* de l'ordre de 10 individus seulement. On imagine aisément l'extraordinaire difficulté d'une telle entreprise et le nombre d'essais d'approche qu'elle a nécessité.

Nous sommes néanmoins parvenus à des résultats satisfaisants en procédant de la manière suivante :

Une culture de *B. Coli* en eau peptonée a été repiquée tous les jours à la même heure, au même taux (1/10 de cm³ de culture pour 10 cm³ d'eau peptonée) pendant plusieurs semaines. Chaque jour, à l'heure précise du repiquage, une dilution convenable était commencée sur milieu solide (ORLA-JENSEN) aux fins de numération. Peu à peu la culture s'est stabilisée à une richesse comprise entre

500 millions et 800 millions de germes au cm^3 . Dès lors, nous possédions le moyen de disposer, n'importe quel jour (mais à une heure bien déterminée), d'une culture de *B. Coli* dont la richesse était connue avec une approximation suffisante. En diluant progressivement la culture avec de très grands soins (eau tiède, agitation pendant une demi-heure à chaque dilution nouvelle) nous pouvions espérer obtenir une dernière dilution dont 1 cm^3 contiendrait approximativement le nombre de germes cherché.

Quel est le degré d'exactitude de ce procédé ? Et comment le contrôler ?

En pratique, en ensemençant sur milieu solide, à plusieurs reprises, 1 cm^3 de cette dernière dilution nous voyions apparaître, après 24 heures d'étuve, un nombre de colonies de *B. Coli* qui ne s'écartait pas, en plus ou en moins, de plus de 25 à 30 % du chiffre prévu. (Ce nombre n'augmentait plus après un plus long séjour à l'étuve, car le *coli* pousse très vite sur milieu d'ORLA-JENSEN.)

Exemples : Ayant désiré obtenir une dilution contenant n germes au cm^3 , nous avons obtenu par repiquages successifs de 1 cm^3 les nombre de colonies que voici :

Nombre de germes prévu (n)	Nombre de colonies obtenu sur 5 numérations parallèles					Moyenne
5	7	4	6	8	3	5,6
5	6	6	5	3	2	4,4
10	12	7	8	8	7	8
10	7	12	5	10	12	9
10	9	5	10	12	11	9,4
20	17	15	21	17	18	17,6
20	17	19	16	23	21	19
25	21	24	18	28	29	24
25	23	24	30	24	24	25
30	32	42	30	29	32	33
40	41	37	36	35	40	37,8

Pour qui a la pratique des manipulations bactériologiques, ces résultats sont manifestement intéressants.

Comme contre-épreuve, et pour qu'on ne puisse pas supposer que ces colonies étaient dues à des infections accidentelles avec absence complète de *B. Coli*, nous avons introduit ces mêmes doses de la dernière dilution dans des tubes d'eau peptonée. L'indol s'étant révélé toujours positif sur tous ces tubes, nous étions fondés à admettre que notre dernière dilution contenait bien au cm^3 , au moins 1 germe de *B. Coli*, et au plus, le nombre maximum donné

par la culture sur plaques la plus riche. Nous étions dès lors en possession du moyen d'introduire dans une fiole quelconque une dose de *B. Coli* extrêmement petite, connue avec une approximation suffisante et nous avons en même temps le moyen de vérifier la valeur des doses extrêmes introduites.

3° QUANTITÉ DE FERMENTS LACTIQUES A METTRE EN ŒUVRE

Il ne s'agit pas ici de faire une étude complète de la concurrence vitale entre les ferments lactiques et le B. Coli, mais seulement de rester dans le cas pratique que nous nous sommes tracé : mettre en présence des traces de *B. Coli* et des doses de ferments lactiques de l'ordre de celles que l'on rencontre dans les laits où, précisément, le *B. Coli* est en si petite quantité, que les méthodes habituelles ne permettent pas de le retrouver.

Quelles sont ces doses de ferments lactiques ?

Pour les laits qui viennent de subir une excellente pasteurisation, de même que pour certains laits du commerce très peu souillés, la dose de germes totaux, quels qu'ils soient, n'excède pas quelques milliers, souvent même quelques centaines au cm³. Dans ces deux cas, il est extrêmement rare que la recherche du *B. Coli* soit positive sur un centimètre cube (par les méthodes classiques).

Nous distinguerons, à cet égard, 3 classes de laits :

a) Laits sortant du pasteurisateur. — Si la pasteurisation a été bien faite (au moins 65° pendant 30 minutes, ou pasteurisation haute très aseptique) la recherche du *B. Coli* est toujours négative sur un centimètre cube et souvent négative aussi après incubation d'un échantillon important. Le nombre de ferments lactiques contenus dans ces laits est ordinairement très faible. Dans les pasteurisations basses, on rencontre des lactiques thermophiles, mais leur nombre dépend de la pureté du lait cru initial, donc des conditions d'asepsie qui ont présidé à la traite.

Si la pasteurisation a été mal conduite (asepsie non rigoureuse, température de pasteurisation basse inférieure à 65° : 63° par exemple qui laisse inévitablement un peu de *B. Coli*) il arrive qu'on ne retrouve pas de *coli* sur 1 centimètre cube mais l'incubation d'un échantillon important le met toujours en évidence.

Ce sera là, vraisemblablement, l'intérêt principal de notre étude : contrôle rigoureux des pasteurisations.

Le nombre de ferments lactiques d'un lait pasteurisé d'une façon incomplète ou non aseptique est évidemment très variable, mais reste néanmoins toujours faible : quelques milliers au cm³, rarement plus de 10.000. Les thermophiles et les sporogènes de ces laits dépendent aussi des conditions de la traite.

Voilà donc une première catégorie de laits, relativement pauvres

en ferments lactiques, pauvres ou très pauvres en *coli*, où la recherche de ce germe sur un centimètre cube est presque toujours négative ; catégorie des plus intéressantes pour les recherches poursuivies ici.

b) Lait du commerce très purs. — Presque tous les laits du commerce de grande consommation se ressemblent. Mais il existe quelques laits qui, par les soins tout particuliers dont ils sont entourés, renferment très peu de lactiques et de *coli*. Avec ces laits, la recherche du *B. Coli* sur un centimètre cube est fréquemment négative et l'incubation s'impose. Il existe même un lait (orco) où la recherche du *coli* après incubation de 20 cm³ est toujours négative (moins de 50 coli-bacilles au litre) et où l'incubation de 100, voire de 1.000 cm³, donne très fréquemment des résultats négatifs. Ce lait, qui renferme des quantités de ferments lactiques toujours inférieures à 500 au cm³, a été pris comme type de lait de 1^{er} degré dans la proposition de classement des laits que nous avons établie dans un de nos précédents articles (1).

Il existe d'ailleurs, dans le commerce, d'autres laits spéciaux qui tendent à la même pureté, sans d'ailleurs y atteindre, mais pour qui néanmoins la nécessité d'une incubation du lait pour la recherche du *coli* se fait quelquefois sentir. Les quantités de ferments lactiques de ces laits sont assez variables et peuvent atteindre plusieurs milliers ou plusieurs dizaines de milliers au centimètre cube (Lg compris entre 4 et 5).

Toutes ces catégories de laits sont directement intéressées par les recherches poursuivies ici.

c) Lait du commerce de vente courante. — Des nombreuses analyses bactériologiques que nous effectuons des laits courants du commerce d'origines variées, il ressort, comme nous avons déjà eu l'occasion de le dire, que la recherche du *B. Coli* est presque toujours positive quand l'essai est fait sur 1 centimètre cube de lait. Il s'en suivrait que le procédé par incubation que nous étudions serait sans intérêt pour ces laits.

En réalité, il arrive quelquefois que la recherche du *coli*, néga-

(1) Cette proposition de classement des laits, qui n'a d'ailleurs d'autre prétention que celle de jeter les bases d'un projet, n'est pas admise par le Dr NÉVOT (*Journal Médical Français*, décembre 1932, p. 445) qui nous reproche d'admettre la présence de *B. Coli* dans le lait de premier grade. Nous nous proposons de revenir plus en détail sur cette question. Notons simplement en passant que la condition : « moins de 50 coli au litre » n'implique pas que le lait soit autorisé à en contenir 49 au litre..., mais correspond à une *notion analytique* : « absence de coli sur 20 cc. » Nous voulons substituer, en effet, aux vieilles habitudes de langage, qui se contentent d'évaluations qualitatives : présence ou absence de *coli* dans un lait (?), des *appréciations quantitatives*, une véritable bactériométrie du lait qui présenterait, à notre avis, une autre valeur d'interprétation.

tive sur un centimètre cube, est positive si on opère sur des quantités plus grandes et surtout si on soumet les échantillons à l'incubation préalable. Cette méthode présenterait donc un certain intérêt même dans le cas des laits du commerce courants, dont on ignore toujours *a priori* combien de *B. Coli* ils renferment.

Quelles quantités de ferments lactiques renferment ces laits ?

Nous avons relevé ci-dessous un certain nombre d'analyses effectuées couramment dans nos laboratoires, de laits du commerce d'origine variée. L'analyse a été effectuée au moment de la vente du matin vers 8-9 heures. Nous avons classé ces laits par richesses croissantes en germes vivants au centimètre cube et noté (par les signes + ou 0) le résultat positif ou négatif de la recherche du *B. Coli* effectuée directement sur un centimètre cube de lait.

Mois du prélèvement	Nomb. de germes vivants au cc.	Recher- che du <i>coli</i> sur 1 cc.	Mois du prélèvement	Nomb. de germes vivants au cc.	Recher- che du <i>coli</i> sur 1 cc.
Janvier	400	0	Novembre	9.000	0
Février	500	0	Novembre	10.000	0
Janvier	800	+	Novembre	10.000	+
Février	800	+	Janvier	10.000	+
Novembre	1.000	+	Janvier	10.000	+
Janvier	1.000	+	Janvier	10.000	0
Janvier	1.000	0	Avril	10.300	+
Janvier	1.000	+	Mars	12.800	+
Novembre	1.000	+	Février	13.800	+
Novembre	1.000	+	Novembre	17.000	+
Janvier	1.000	+	Mai	20.000	+
Janvier	1.300	0	Novembre	20.000	0
Janvier	1.400	+	Novembre	20.800	+
Janvier	1.500	0	Novembre	24.000	+
Janvier	1.600	0	Mai	25.000	+
Février	1.700	0	Mars	26.100	+
Janvier	2.400	0	Avril	26.700	+
Janvier	2.500	0	Novembre	26.700	+
Novembre	3.000	+	Mai	28.000	0
Février	3.000	+	Avril	28.100	0
Mars	3.200	0	Avril	28.900	+
Février	3.600	+	Mars	32.000	0
Février	3.800	+	Avril	32.200	+
Janvier	3.800	+	Mars	32.400	+
Mars	3.900	0	Février	32.600	+
Février	4.000	0	Janvier	33.000	+
Janvier	5.000	+	Janvier	38.000	0
Décembre	5.000	+	Octobre	40.000	+
Novembre	6.700	+	Novembre	42.000	+
Mars	8.100	0	Mars	42.800	0

Mois du Prélèvement	Nomb. de germes vivants au cc.	Recher- che du <i>coli</i> sur 1 cc.	Mois du prélèvement	Nomb. ds germes vivants au cc.	Recher- che du <i>coli</i> sur 1 cc.
Janvier	46.000	0	Mai	271.000	0
Novembre	48.000	+	Mars	277.200	+
Mai	54.000	0	Février	279.000	+
Avril.....	57.200	+	Janvier	293.000	+
Avril.....	60.000	0	Mars	300.000	+
Octobre	60.000	+	Novembre	317.000	+
Janvier	61.600	0	Mai	324.000	+
Octobre	70.000	+	Janvier	339.000	+
Avril.....	75.000	+	Février	384.000	+
Novembre	80.000	+	Janvier	407.000	+
Février	80.100	0	Mai	424.000	0
Avril.....	82.900	+	Mars	424.800	+
Mars	85.000	+	Juillet	478.000	+
Janvier	86.000	+	Mars	576.000	+
Avril.....	88.000	0	Janvier	576.000	+
Avril.....	96.000	+	Octobre	701.000	+
Janvier	98.300	+	Février	708.000	0
Mai	101.000	+	Octobre	775.000	+
Mai	103.000	0	Juin	786.000	+
Octobre	104.000	+	Juin	818.000	+
Février	109.000	+	Mars	876.000	+
Mai	119.000	+	Juillet	1.068.000	+
Janvier	122.000	+	Mai	1.079.000	+
Mars	139.200	+	Mai	1.334.000	+
Avril.....	142.400	+	Juin	1.348.000	+
Mars	144.400	+	Octobre	1.698.000	+
Juin	145.000	+	Mars	1.740.000	+
Novembre	147.000	+	Mai	1.932.000	+
Avril.....	151.600	+	Juillet	2.590.000	+
Mars	153.000	+	Mars	2.774.000	+
Mars	158.400	+	Novembre	3.136.000	+
Mai	191.000	0	Juillet	3.450.000	+
Mai	193.000	+	Septembre	4.336.000	+
Avril.....	200.800	+	Mai	4.856.000	+
Septembre	204.000	+	Mai	5.652.000	+
Octobre	210.000	+	Mai	5.768.000	+
Février	225.000	+	Octobre	6.650.000	+
Mai	247.000	+	Mai	19.900.000	+
Mars	260.200	+			

On a donc eu, sur 137 laits, 33 recherches de *coli* sur 1 centimètre cube *négligentes*, soit 24 %. Bien entendu, c'est surtout d'octobre à mars qu'on rencontre ces laits ;

27 % des laits d'automne-hiver ont donné un résultat négatif et 18 % seulement pour les laits de printemps-été (1).

Pour la même raison, ce sont les moins riches en germes totaux qui ont donné le plus de résultats négatifs à la recherche du *coli* sur 1 centimètre cube. En effet, ce résultat a été acquis sur :

- 48 % des laits contenant moins de 10.000 germes au cm³.
- 29 % des laits contenant de 10.000 à 100.000 germes au cm³.
- 12 % des laits contenant de 100.000 à 250.000 germes au cm³.
- 10 % des laits contenant de 250.000 à 500.000 germes au cm³.
- 4 % des laits contenant plus de 500.000 germes au cm³.

Comme ce sont précisément ces laits, où la recherche directe du *coli* sur 1 centimètre cube s'est avérée négative, qui nous intéressent, et comme, d'autre part, des laits contenant jusqu'à 500.000 germes peuvent entrer, quoique rarement, dans cette catégorie, la quantité de ferments lactiques que nous avons à choisir pour nos essais doit atteindre ce chiffre. Nous nous imposerons donc de pousser la recherche à tous les cas possibles, y compris ceux où, *a priori*, la méthode semblerait la moins nécessaire : celle des laits très chargés en germes.

Rien n'était plus facile alors que de réaliser artificiellement ces conditions : sept variétés de ferments lactiques cultivés séparément à l'état pur étaient mélangés au moment de l'expérience. Nous connaissions le nombre approximatif d'individus grâce à un artifice de repiquages et de numérations quotidiens analogues à celui qui a été décrit précédemment pour le *B. Coli*.

La quantité calculée de la culture était introduite dans les litres bicarbonatés stériles au moment de l'expérience. Un contrôle de ce nombre était fait sur le laitensemencé lui-même par culture sur plaques de gélose.

En résumé :

1^o Nous avons réalisé le moyen d'obtenir des laits stériles où les ferments lactiques ne produiront pas d'acidité et où l'influence « germe à germe » pourra apparaître.

(1) Profitons de ce tableau pour en tirer un autre enseignement intéressant. Proportion des laits de différentes richesses bactériennes.

	Printemps- été	Automne- hiver
Moins de 10.000 germes au cc.	Néant	33 %
de 10.000 à 100.000 germes au cc.	34 %	33 %
de 100.000 à 500.000 germes au cc.	34 %	21 %
de 500.000 à 5 millions de germes au cc.	31 %	12 %

En résumé : Dans les saisons printemps-été les 2/3 des laits du commerce contiennent plus de 100.000 germes au cc. (jusqu'à plusieurs millions) et 1/3 seulement en contiennent moins de 100.000 ; en automne-hiver les proportions sont inversées : 2/3 des laits font moins de 100.000 germes, 1/3 seulement dépassent 100.000.

2° Nous avons fixé les doses de *B. Coli* à utiliser, ainsi que le moyen de les obtenir.

3° Nous avons passé en revue les doses de lactiques qu'il conviendrait d'employer : faibles (quelques centaines ou quelques milliers au centimètre cube) pour les laits sortant des pasteurisateurs ou les laits du commerce les plus purs, ces doses peuvent devoir être très élevées (plusieurs centaines de mille ou plusieurs millions) pour envisager le cas où, malgré des taux de pollution ou de prolifération élevés, le *coli* n'apparaît pas sur 1 centimètre cube et nécessite une incubation préalable du lait (cas d'ailleurs fort rares).

Il s'agit de savoir maintenant si la présence de ces doses variées de ferments lactiques (en l'absence d'acide lactique) va, ou non, gêner la prolifération de petites quantités de *coli* permettant des repiquages aux fins d'identification.

§ 2. RÉSULTATS OBTENUS

A) Technique des essais : Des litres de lait stérile chargés aseptiquement de 6 gr. de bicarbonate de soude stérilisé suivant la technique exposée plus haut, sontensemencés le matin des doses de *B. Coli* prévues (10, 20 germes au litre) et obtenues comme il a été dit. Les ferments lactiques sont introduits aussitôt en quantités variant, suivant les expériences, de quelques milliers à 500.000 et même quelques millions au centimètre cube de lait, bien que ces quantités ne soient plus nécessaires. La numération des quantités de *B. Coli* introduites est effectuée immédiatement, de même que les numérations des lactiques sur le lait, à titre de contrôle. Puis tous les flacons de 1 litre (qui ont été au préalable amenés à 37°) sont portés à l'étuve à 37°.

Les mêmes ensemencements de lactiques sont faits sur des litres témoins non bicarbonatés pour vérifier, à titre documentaire, la quantité d'acide lactique saturée pendant l'incubation par le bicarbonate.

Après 8 heures de séjour à l'étuve, on procède aux repiquages de 1 centimètre cube de lait à plusieurs reprises différentes dans des fioles d'eau peptonée de 100 cm³ (et non de 10 cm³ pour des raisons qui seront exposées ultérieurement) et on met à l'étuve. La réaction de l'indol est effectuée 24 heures après (1) avec le réactif d'Erlich-Kovacs. Tous les repiquages ayant donné la réaction de l'indol indiquent que, en fin d'incubation, on avait *au moins un coli* au centimètre cube dans le lait. Si parmi les repiquages d'un même lait,

(1) Les repiquages n'ayant pas donné d'indol en 24 h. n'en ont jamais donné après plusieurs jours. Nous reviendrons sur cette question de la production de l'indol dans l'un de nos prochains articles.

les uns sont positifs et les autres négatifs, on en déduira que l'incubation nous a amenés à la limite de la prolifération nécessaire.

B) Résultats obtenus : Nous ne reproduirons pas le détail de tous les essais effectués, mais seulement à titre d'exemple, deux gammes d'essais correspondant à des doses de *coli* de l'ordre de 10 ou 20 au litre, avec des doses de ferments lactiques variées.

ENVIRON 10 COLI AU LITRE		ENVIRON 20 COLI AU LITRE	
Nombre de lactiques introduits au cc. de lait	B. <i>Coli</i> dans les repiquages de 1 cc.	Nombre de lactiques introduits au cc. de lait	B. <i>Coli</i> dans les repiquages de 1 cc.
1.500	+ + + +	3.000	+ + + +
4.700	+ + + +	3.400	+ + + +
11.200	+ + + +	38.000	+ + + +
25.000	+ + + +	55.000	+ + + +
39.000	+ + + +	71.000	+ + + +
68.500	+ + + +	85.000	+ + + ?
200.000	+ + + +	109.000	+ + + +
464.000	+ + 0 0	400.000	+ + + +
500.000	0 0 0 0	910.000	+ + + +
940.000	0 0 0 0	1.180.000	0 0 0 0
1.660.000	0 0 0 0	2.800.000	0 0 0 0

C) Commentaires. — Pour des doses de *B. Coli* de l'ordre de 10 au litre, l'incubation de 8 heures permet une prolifération suffisante à des repiquages de 1 centimètre cube positifs, lorsque le nombre de ferments lactiques au départ ne dépasse pas 200.000 environ au centimètre cube de lait.

Pour des doses de *B. Coli* de l'ordre de 20 au litre, les repiquages de 1 centimètre cube sont positifs lorsque le nombre de ferments lactiques au départ ne dépasse pas 900.000 environ au centimètre cube de lait.

§ 3. CONCLUSION DES ESSAIS PRÉCÉDENTS

Ces essais nous montrent que, dans les conditions où nous avons opéré, la présence des ferments lactiques peut constituer, dans une certaine mesure, un obstacle à la prolifération du *B. Coli* dans le lait : l'influence germe à germe en l'absence d'acide lactique libre, quoique variable, est indéniable. Mais, pour le but poursuivi ici, cette influence se limite en pratique aux données suivantes :

Quand, dans un lait où l'acidité lactique ne peut apparaître, on met en présence :

— des doses de lactiques inférieures à 900.000 germes au centimètre cube avec des doses de *coli* de l'ordre de 20 au litre,

— des doses de lactiques inférieures à 200.000 germes au centimètre cube avec des doses de *B. Coli* de l'ordre de 10 au litre,

le Coli se développe suffisamment en 8 heures d'étuve pour que des repiquages de 1 centimètre cube effectués à ce moment, emportent avec certitude du Bacterium Coli, condition nécessaire et suffisante au but analytique poursuivi ici.

Remarque : Des essais analogues ont été entrepris avec d'autres germes que les ferments lactiques, mais pas à la même échelle. Nous avons simplement observé que des mélanges de *B. Coli*, en petite quantité, et de *B. Subtilis*, de *lactis aerogenes*, de *proteus vulgaris*, tous ces germes étant en grande abondance et expérimentés séparément, ne s'opposent pas à la prolifération abondante du *B. Coli*, sans d'ailleurs que nous ayons précisé numériquement l'effet de cette co-incubation sur le développement du *coli*.

Hâtons-nous de dire que dans les laits courants, ils sont, ou bien peu abondants ou bien moins nombreux que les ferments lactiques, et que dans la pratique nous parvenons couramment à déceler des traces de *B. Coli*, malgré la présence fréquente de germes étrangers les plus variés. Il semble donc qu'il n'y ait pas à s'inquiéter, dans la pratique courante, de l'influence sur la prolifération du *B. Coli* au cours de l'incubation à l'étuve, d'un germe étranger faisant partie de la flore habituelle du lait.

* * *

Au point où nous en sommes de l'exposé de toutes ces recherches, nous connaissons *l'influence de l'acide lactique* et *l'influence des corps microbiens* des ferments lactiques seuls sur le développement du *B. Coli* dans le cadre de notre travail.

Or, dans la pratique, on se trouve en présence de ferments lactiques produisant normalement de *l'acide lactique libre*. Leur influence sur le développement du *B. Coli* ne peut-elle se déduire de nos travaux précédents ? On est tenté de supposer, en effet, que cette influence est égale à la somme des deux autres.

Mais :

1^o Les essais sur l'influence de l'acide lactique ont été faits dans des conditions nécessairement artificielles, par apports successifs d'acide, rappelant autant que possible la marche d'une acidification naturelle.

2^o L'acide lactique qui a agi dans ces expériences était *apporté* de l'extérieur et non pas *produit* par des ferments lactiques au sein du lait.

3° Enfin nous n'avons pas le droit de dire, *a priori*, que l'influence de deux causes agissant simultanément serait égale à la somme des influences séparées de ces deux causes étudiées isolément.

Pour toutes ces raisons, les déductions précédentes doivent être soumises à l'épreuve de la pratique.

C'est pourquoi, toujours conformément à notre plan initial, nous exposerons dans notre prochain article les résultats obtenus dans « *l'influence sur la prolifération de petites quantités de coli, des ferments lactiques produisant de l'acide lactique libre.* »

(à suivre.)

LES DERNIERS RÉSULTATS OBTENUS DANS LE DOMAINE DES RECHERCHES SUR LA MASTITE, EN PARTICULIER LA LUTTE CONTRE LA « GALT » (1)

par M. SEELEMAN

Collaborateur scientifique à l'Institut bactériologique
de l'Etablissement d'Essais et de Recherches
pour l'Economie laitière à Kiel.

La question de la mastite est devenue de nos jours un problème de première importance dans tous les pays laitiers, ce qu'on aurait à peine prévu il y a quelque dix ans. De nombreux travaux effectués après la guerre ont montré le développement effrayant des inflammations du pis, et notamment de la mastite streptococcique. Nos travaux à l'Institut de Kiel, ont spécialement porté sur la situation à ce point de vue dans le Sleswig-Holstein. Les appels à l'aide de l'agriculture se sont multipliés en ces derniers temps, soit que les pertes financières provoquées par l'épidémie aient été ressenties d'autant plus nettement que l'agriculture allemande se trouve depuis des années dans une situation catastrophique, soit que les mesures de contrôle et de surveillance introduites et développées sur une plus grande échelle dans les effectifs du bétail laitier aient seulement depuis peu fait ressortir clairement les dangers de la situation.

Des recherches systématiques effectuées dans le Sleswig-Holstein et ayant porté sur environ 180 troupeaux réunissant plus de 8.000 vaches, ont accusé un pourcentage de 33 % de vaches malades de la « galt » jaune ; à ce nombre il faut ajouter environ 20 % de cas que j'ai désignés sous le nom de troubles non spécifiques de la sécrétion. Donc, dans chaque étable, une vache sur deux environ

(1) Rapport présenté au IX^e Congrès international de Laiterie, Copenhague, 17 juin 1931. Publié dans *Berliner tierärztliche Wochenschrift*, décembre 1931, 47-50.