LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- J. PIEN, J. BACHIMONT et
R. FILHOL. — Sur la recherche du *Bacterium coli* dans le lait (fin) 817
- J. BRIGANDO. — Recherches sur la caséine (suite) 843
- B. VAN DER BURG. — Le liquide dans le beurre (fin) 866
- E. HAGLUND, E. SANDBERG et Chr. BARTHEL. — Sur l'influence de différents facteurs sur la tendance à la fermentation gazeuse précoce du fromage (fin) 874
- Soncke KNUDSEN et M. JENSEN. — Quelques recherches sur la conservation du beurre (fin) 885
- Mme C. VINCENT et J. VIAL. — Contribution à l'étude de la lactation humaine (à suivre) 904

Bibliographie analytique :

- 1^o Les livres 915
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 919
- 3^o Brevets 932

Bulletin bibliographique :

- 1^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 935

Documents et informations :

- HOUDINIÈRE. — Consommation et inspection du lait à Nancy (à suivre) 938
- Concours pour la recherche du meilleur procédé ou appareil permettant la discrimination certaine et rapide des laits titrant plus ou moins de 20^o d'acidité Dornic 944

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

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

des Laboratoires des « Fermiers Réunis »

(Fin.)

CINQUIÈME ARTICLE

Le but que nous poursuivons, avons-nous déjà dit, est le suivant : Préciser la technique à adopter pour rechercher de très petites quantités de *B. Coli*, de l'ordre de 10 ou 20 individus au litre, indispensable pour le contrôle des pasteurisations et l'étude des laits très purs. Il ne faut pas songer à travailler sur 50 cm³ ou 100 cm³ de lait qu'onensemencerait dans de l'eau peptonée, car, ce que nous avons

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

démonstré sur l'influence de l'acide lactique dans la prolifération du *B. Coli* en eau peptonée, nous apprend qu'il faudrait des volumes d'eau peptonée très supérieurs à 10 et 20 fois le volume du lait introduit (1). Les 50 ou 100 cm³ de lait devraient donc être introduits en une fois dans des volumes de plusieurs litres d'eau peptonée (voir 10 litres et plus); ce qui est pratiquement irréalisable dans le contrôle courant.

Restait l'hypothèse d'une incubation spontanée du lait à l'étuve, suivie de repiquages après un nombre d'heures suffisant. En cas de repiquages positifs, on peut évidemment affirmer qu'on avait à l'origine au moins un germe dans les 50 ou 100 cm³ de lait soumis à l'incubation. Mais, en cas de résultat négatif, on ne peut pas affirmer que le lait ne contenait aucun germe de *B. Coli* dans l'échantillon, car on ignore si les conditions imposées à cet échantillon ont permis au *B. Coli* éventuellement présent de se développer normalement et de proliférer suffisamment pour permettre des repiquages positifs en fin d'expérience.

Les ferments lactiques présents à côté du *B. Coli* (qu'il s'agisse d'un pasteurisateur fonctionnant mal ou d'un lait pollué, même légèrement, après pasteurisation) vont-ils concurrencer celui-ci par leur présence et même le gêner par l'acide lactique qu'ils produisent ?

Ces deux influences ont été étudiées séparément dans nos recherches précédentes qui nous ont appris :

1^o Que l'acide lactique seul, amené à doses croissantes pendant 8 heures pour reproduire l'acidification spontanée à l'étuve des laits courants, n'est pas capable d'empêcher la prolifération du *B. Coli*. Un germe unique au départ dans 100 cm³ de lait correspondant à 10 au litre, est suffisamment développé en 8 heures pour permettre un repiquage positif avec 1 cm³.

2^o Que les ferments lactiques seuls, ne produisant pas d'acidité libre (par un artifice de culture) constituent une gêne certaine à la prolifération du *B. Coli*, du moins dans les conditions où nous avons opéré, c'est-à-dire avec une disproportion énorme entre la quantité des lactiques et du *B. Coli*.

Ces résultats ne suffisent pas encore, avons-nous dit, à nous permettre de répondre à la question : l'incubation de l'échantillon est-elle possible et dans quelles limites ?

Il faut en arriver à l'expérimentation directe des deux influences simultanées : ferments lactiques et acide lactique, sur le développement du *B. Coli*.

(1) Nous y revenons au point de vue pratique, ci-après (technique des repiquages).

Tel est l'objet du présent article qui va nous mener aux conclusions analytiques d'ordre pratique, but final de notre étude.

* * *

INFLUENCE SIMULTANÉE DES FERMENTS LACTIQUES ET DE L'ACIDE LACTIQUE SUR LA PROLIFÉRATION DU *B. COLI* EN LAIT

1. Technique suivie. — Cette étude est, maintenant, grandement facilitée par celle qui a été faite de l'influence des corps microbiens des ferments lactiques (relatée dans notre précédent article). Il suffit, en effet, de reprendre les techniques précédentes en supprimant l'artifice qui nous avait permis d'empêcher l'acidité lactique libre d'apparaître. La technique va donc, ici, se réduire à ceci :

Onensemencera des litres de lait stérile avec des ferments lactiques en quantités abondantes et connues et avec du *B. Coli* en très petite quantité (de l'ordre de 10, 20, 30 germes au litre). Après 8 heures d'incubation à 37°, on procède à plusieurs repiquages de 1 cm³ dans des fioles contenant 100 cm³ d'eau peptonée stérile. La réaction de l'indol est faite 24 heures après avec le réactif d'Ehrlich-Kovacs (1).

Tous les repiquages de 1 cm³ donnant la réaction de l'indol, correspondent évidemment à au moins un *coli* dans un centimètre cube de lait en fin d'incubation, c'est-à-dire à une incubation *suffisante et convenable* au but poursuivi. Dans le cas contraire, on en déduira que l'incubation a été fatale au *coli* ou insuffisante à le développer dans les conditions que nous nous imposons.

Remarques. — 1° Les quantités de *B. Coli* à introduire sont obtenues par la technique antérieurement indiquée. Il est inutile d'y revenir.

2° Quant aux quantités de lactiques à mettre en œuvre, nous les définirons ici d'une façon particulière, par la quantité d'acide lactique produit pendant l'incubation. Il faut, en effet, songer à l'application pratique : il sera impossible de connaître à l'avance la quantité de ferments lactiques contenus dans un échantillon de lait; la numération elle-même ne renseignera pas, car, outre qu'elle sera seulement connue quelques jours plus tard, elle donnera un chiffre de germes totaux toujours supérieur au nombre de ferments lactiques, sans qu'on puisse aisément connaître le pourcentage de ces derniers. Le mieux est de titrer l'acidité en fin d'incubation,

(1) L'expérience nous a montré que dans les conditions où nous avons opéré, les repiquages qui ne donnent pas d'indol après 24 heures, n'en donnent jamais et ne contiennent pas de *B. Coli*.

ce qui est une manière simple de juger de l'importance relative du nombre de lactiques présents au départ, de la quantité d'acide lactique formé et par conséquent de trancher la question de savoir si l'incubation est ou non susceptible de nous renseigner. Nous avons donc conduit les essais dans les mêmes conditions que celles qui seront proposées dans la pratique.

2. Résultats obtenus. — Le tableau ci-dessous montre les résultats que nous avons obtenus, classés par quantités de *B. Coli* croissantes, et dans chaque cas par les acidités obtenues après 8 heures d'incubation sous l'influence des ferments lactiques introduits.

Nombre de germes de <i>B. Coli</i> introduits par litre de lait	Acidité obtenue après 8 heures d'incubation en degrés Dornic	<i>B. Coli</i> dans les repiquages de 1 cm ³
5 ou moins de 5	44°	0 0 0 0
	47°	0 0 0 0
	52°	0 0 0 0
	66°	0 0 0 0
	78°	0 0 0 0
	79°	0 0 0 0
	83°	0 0 0 0
	98°	0 0 0 0
De 7 à 10	37°	+ + + +
	43°	+ + + +
	47°	+ + + +
	55°	+ + + +
	64°	0 0 0 0
	71°	0 0 0 0
	79°	0 0 0 0
	79°	0 0 0 0
	80°	0 0 0 0
	81°	0 0 0 0
	83°	0 0 0 0
	88°	0 0 0 0
	94°	0 0 0 0
	99°	0 0 0 0
	101°	0 0 0 0
	104°	0 0 0 0
	112°	0 0 0 0

Nombre de germes de <i>B. Coli</i> introduits par litre de lait	Acidité obtenue après 8 heures d'incubation en degrés Dornic	<i>B. Coli</i> dans les repiquages de 1 cm ³
De 12 à 15	45°	+ + + +
	54°	+ + + +
	60°	+ + + +
	63°	+ + + +
	64°	0 0 0 0
	70°	0 0 0 0
	74°	0 0 0 0
	75°	0 0 0 0
	75°	0 0 0 0
	76°	0 0 0 0
	77°	0 0 0 0
	78°	0 0 0 0
	81°	0 0 0 0
	82°	0 0 0 0
Environ 20	36°	+ + + +
	47°	+ + + +
	49°	+ + + +
	61°	+ + + +
	66°	+ + + +
	85°	+ + + +
	85°	+ + + +
	85°	+ + + +
	96°5	0 0 0 0
De 25 à 30	105°	0 0 0 0
	49°	+ + + +
	52°	+ + + +
	55°	+ + + +
	55°	+ + + +
	57°	+ + + +
	77°	+ + + +
	88°	+ + + +
	95°	+ + + +
	98°	+ + + +

Ces résultats peuvent se traduire par un graphique qui fait apparaître une zone limite assez régulière (page 822).

3. Commentaires. — Ces résultats nous montrent que lorsque de petites quantités de *B. Coli* sont présentes dans un lait contenant en même temps des quantités quelconques de ferments lactiques et

TABLEAU MONTRANT COMMENT LES ACIDITÉS OBTENUES EN FIN D'INCUBATION INFLUENCENT LES REPIQUAGES DANS LA RECHERCHE DES TRACES DE *B. COLI*

que ce lait est mis à l'étuve à 37°, après 8 heures d'incubation on ne peut retrouver du *coli* sur 1 cm³ que si les acidités suivantes ne sont pas dépassées au bout de ce temps :

- 1° 85° Dornic pour 20 *coli* au litre avant l'incubation ;
- 2° 60-65° Dornic pour 12 à 15 *coli* au litre avant l'incubation ;
- 3° 55-65° Dornic pour 7 à 10 *coli* au litre avant l'incubation ;
- 4° Un chiffre certainement inférieur à 44° Dornic pour 5 et moins de 5 *coli* au litre avant l'incubation. Nous n'avons pas pu préciser cette limite inférieure en raison de l'extrême difficulté des essais dans cette zone.

Notons aussi que pour des quantités de *B. Coli* de l'ordre de 25 à 30, l'acidité peut monter à 100° Dornic en 8 heures sans empêcher la possibilité de repiquages positifs au bout de ce temps.

Il ressort donc de ceci, et avec une assez grande netteté croyons-nous,

qu'il y avait lieu d'être prudent en envisageant l'hypothèse de l'incubation spontanée des échantillons de lait pour y découvrir des traces de coli. Si l'échantillon contient beaucoup de ferments lactiques capables de produire par exemple 100° Dornic en 8 heures à 37°, il faut renoncer à l'espoir de retrouver du *B. Coli*, s'il y en avait moins de 20 au litre avant l'incubation.

On pourrait nous répondre qu'on résoudrait sans doute la question en prolongeant l'incubation au delà de 8 heures. Il n'en est rien ; car, ainsi que nous l'avons montré, le coli ne se développe plus quand l'acidité du lait dépasse 60° Dornic environ. Si nous en retrouvons ici à des acidités supérieures, c'est que ces acidités se sont produites progressivement et que, pendant plusieurs heures, le *B. Coli*, a proliféré au contact d'acidités plus faibles. Mais, passé ce cap, le coli ne se développe plus. Une incubation plus longue serait pour le moins inutile et d'autres essais en cours nous ont montré qu'elle serait nuisible puisque le *B. Coli* meurt à la longue en présence d'acidités plus élevées.

4. Conclusions pratiques. — De ce qui précède nous pouvons conclure que :

1° Pour tous les laits, même dans le cas le plus défavorable d'acidification rapide, on est certain de retrouver du coli même s'il n'y en avait que 20 au litre avant l'incubation. Si les repiquages donnent des résultats négatifs pour une acidité finale de l'incubation inférieure à 85° Dornic (1), on peut affirmer qu'il y avait moins de 20 coli au litre au départ, mais sans pouvoir préciser davantage.

2° Si l'acidification n'a pas dépassé 55° Dornic, le coli se retrouve, même s'il n'y en avait que 10 environ au litre. Si, avec cette acidité finale, les repiquages sont négatifs, on peut affirmer qu'il y avait moins de 10 coli au litre au départ.

3° Enfin, si l'acidité n'a pas monté du tout, l'absence de repiquages positifs peut s'interpréter comme une absence complète de *B. Coli* dans l'échantillon. On sait en effet, d'après nos articles précédents, qu'en l'absence d'acide lactique libre, le coli se multiplie assez en 8 heures pour qu'un seul germe au départ donne des repiquages positifs après l'incubation.

Ces résultats nous fournissent le moyen d'appliquer en connaissance de cause la méthode d'incubation à l'enrichissement d'un échantillon de lait en *B. Coli* quand celui-ci est présent en petites quantités. Ils nous permettront également d'en interpréter les résultats. Il s'agit maintenant de passer à la pratique et de mettre cette méthode en application en la complétant comme il convient. Aupa-

(1) Aucun lait mis non caillé à l'étuve, ne dépasse cette acidité en 8 heures ; de sorte que ce premier paragraphe est d'une portée tout à fait générale.

ravant, il nous reste encore un point à fixer qui paraît avoir échappé aux auteurs qui se sont occupés de la recherche du *B. Coli* dans le lait, et dont l'importance nous est apparue capitale : il s'agit du rapport entre la quantité de lait introduit dans un milieu de culture et le volume de ce milieu. Cette question intéresse certains ensemencements et repiquages et doit être réglée avant de passer aux applications pratiques.

* * *

REMARQUE GÉNÉRALE IMPORTANTE CONCERNANT LA TECHNIQUE DES ENSEMENCEMENTS ET REPIQUAGES.

Nous avons montré, dans nos articles précédents, que le *B. Coli* ne se développe pas dans l'eau peptonée si celle-ci contient 1 gr. 5 (ou plus) d'acide lactique libre par litre. Or, quand on introduit du lait dans l'eau peptonée non sucrée pour y faire proliférer le *coli*, on introduit en même temps des ferments lactiques. Ceux-ci, très rapidement, acidifient le milieu grâce au lactose apporté par le lait et d'autant plus rapidement qu'ils sont plus nombreux. Si on a introduit 1 cm³ de lait dans 10 cm³ d'eau peptonée (ou 10 dans 100) la quantité de lactose incorporée au milieu est le dixième du lactose du lait, soit environ 5 gr. par litre, capables théoriquement de donner environ 5 gr. d'acide lactique par litre (1). Si la transformation est totale, il est clair qu'on dépasse de beaucoup le « seuil d'acidité » du *B. Coli* en eau peptonée. En pratique, cette transformation n'est pas toujours totale (2). Nous avons dosé l'acide lactique libre produit en 24 heures dans une eau peptonée initialement neutre par l'introduction de 10 % de lait chargé de ferments lactiques en quantités variables. Voici quelques-uns des chiffres trouvés en acide lactique par litre :

3 gr. 8 — 3 gr. 6 — 4 gr. 8 — 3 gr. 1 — 5 gr. — 4 gr. 5 — 5 gr. —
3 gr. 5 — 4 gr. 7 — 5 gr. 2 — 3 gr. 3 — 3 gr. 8 — 5 gr. — 4 gr. 2 —
4 gr. 5 — 3 gr. 8...

Tous ces chiffres sont supérieurs à 3 gr. par litre et atteignent souvent le maximum théorique de 5 gr. Toujours, nous étions au-dessus de 1 gr. 5, quelque faible que soit la dose de ferments lactiques contenus dans le lait.

Or :

1° Il arrive, quand les ferments lactiques sont nombreux, que cette acidité limite de 1 gr. 5 est *très vite* atteinte et dépassée.

(1) On sait que 342 gr. de lactose peuvent donner 360 gr. d'acide lactique.

(2) Dans du lait pur on n'obtient jamais l'acidification totale théorique qui correspondrait à 500° Dornic, parce que l'acidité produite gêne les ferments lactiques. Mais dans l'eau peptonée additionnée de 10 % de lait, l'acidité maximum possible de 50° Dornic peut être atteinte puisque, à cette acidité, les ferments lactiques sont encore en pleine activité.

2° D'autre part, le *B. Coli* peut être très rare dans le lait introduit.

On se trouve donc souvent dans la situation où le *B. Coli* ne peut plus proliférer ; et, s'il est peu abondant dans le repiquage, les effets qu'on attendait de sa prolifération dans l'eau peptonée ne se produisent pas. Ils n'apparaissent que si le *B. Coli* était très abondant à l'ensemencement. On observe alors surtout le travail des germes présents, mais non leur développement. Pour mettre ce phénomène parfaitement en évidence, il faudrait faire comparativement le dosage de l'indol produit d'heure en heure (il augmente) et la numération du *B. Coli* qui ne doit pas progresser et doit même diminuer si l'acidité dépasse trop 1 gr. 5 ; mais cette numération, en présence de lactiques, est impossible.

En résumé : Le fait d'ensemencer du lait contenant lactiques et *coli*, dans de l'eau peptonée à raison de 10 %, constitue une gêne, voire un arrêt total du développement du *B. Coli*.

Conséquence immédiate : la production de l'indol, par exemple, peut être nulle ou indécélable, malgré la présence certaine de *B. Coli*, et cela, quelle que soit la durée du séjour à l'étuve (1). Un nouveau repiquage pourra permettre à la prolifération de repartir puisqu'à ce moment la dilution du lait sera au 1/100 dans le nouveau tube, mais elle ne se produira que si on a repris du *coli*, c'est-à-dire s'il était assez abondant à l'ensemencement.

Ces faits pouvaient se prévoir. Mais nous avons eu soin de les étudier pratiquement et l'expérience la plus démonstrative est la suivante : des laits du commerce chargés de *coli*, introduits en eau peptonée, d'une part, à raison de 1 cm³ dans 10 et, d'autre part, à raison de 1 cm³ dans 100 cm³, donnent très souvent des réactions de l'indol négatives sur le tube de 10 alors qu'elles sont presque toujours positives sur les fioles de 100. La quantité d'indol produite dans 100 cm³, bien qu'elle doive être 10 fois plus diluée que dans le tube de 10, est en réalité bien supérieure en quantité absolue à celle qui est produite dans ce dernier, puisque les fioles de 100 donnent des colorations rouge vif au réactif d'Ehrlich-Kovacs et qu'on n'obtient rien, très souvent, dans le tube de 10. Nous avons ainsi la preuve certaine que la présence de 10 % de lait chargé de lactiques, dans l'eau peptonée, s'oppose comme nous l'avons prévu à la prolifération du *B. Coli*.

Cette technique des ensemencements et repiquages de 1 cm³ de lait dans 10 cm³ d'eau peptonée est donc absolument à rejeter.

(1) N'oublions pas d'ailleurs qu'à cette action empêchante de l'acide lactique sur la croissance du *B. Coli* s'ajoute, au début surtout, l'action du lactose sur la production de l'indol comme nous l'avons montré dans un de nos articles précédents.

Quelle limite faut-il adopter ? La dose de 5 % au lieu de 10 % pour être moins néfaste, l'est encore puisqu'elle nous mène souvent à 2 gr. 5 d'acide lactique par litre, dose trop élevée. Théoriquement 2,5 % pourrait convenir. Nous adoptons 2 % ou mieux, *chaque fois que c'est possible* : 1 %.

Conclusion : Les ensemencements et repiquages en eau peptonée, de lait chargé de lactiques et de *coli*, doivent se faire à raison de 1 % ou 2 % maximum.

* * *

MISE EN APPLICATION DU PROCÉDÉ D'INCUBATION DU LAIT POUR LA RECHERCHE DE PETITES QUANTITÉS DE *B. COLI* ET IDÉE D'UNE MÉTHODE GÉNÉRALE DE NUMÉRATION

Quand on soumet un échantillon de lait à l'analyse, on ignore, bien souvent, l'ordre de grandeur des quantités de *B. Coli* qui s'y trouvent. Il est nécessaire d'être à même de posséder une méthode simple qui permette à la fois la recherche de traces de *B. Coli* et la numération approximative de quantités importantes. Une bonne méthode doit donc comporter deux parties :

1^o Recherche et numération de petites quantités de *B. Coli* (moins de 100 germes au litre).

2^o Numération de quantités importantes.

Et dans chaque cas il y a lieu de prévoir :

1^o L'enrichissement du *B. Coli* dans les prélèvements fractionnés qui sont la base de la numération.

2^o L'isolement du *B. Coli*, dans le cas des prélèvements différentiels où il s'est multiplié.

3^o L'identification du *B. Coli*.

Etudions chacun de ces points.

§ 1.

ENRICHISSEMENT DU *B. COLI* DANS LES PRÉLÈVEMENTS DIFFÉRENTIELS DE NUMÉRATION

1^o CAS DE PETITES QUANTITÉS DE *B. COLI*. — APPLICATION DU PROCÉDÉ PAR INCUBATION DE L'ÉCHANTILLON. — Cette première partie intéresse surtout les laits très purs ou sortant des pasteurisateurs. Un échantillon de 200 cm³ est un minimum ; il est à conseiller d'opérer sur un litre. Il est inutile de souligner la nécessité d'une asepsie rigoureuse lors du prélèvement. La chose est possible avec les pasteurisateurs industriels modernes qui comportent des petits robinets de prélèvement faciles à désinfecter et à flamber.

Nous estimons que, pour la recherche de petites quantités de

B. Coli dans un lait très propre, il est suffisant de savoir si sa teneur en *B. Coli* au litre est comprise dans les intervalles suivants : 100, 50, 20, 10, moins de 10, ce qui correspond à présence ou absence de *B. Coli* sur 10, 20, 50, 100 cm³ ou plus de lait. Ces volumes prélevés aseptiquement sont introduits dans des récipients vides stériles. Tous les récipients sont portés à l'étuve à 37° (on aura soin de porter les récipients de 50, 100 cc. et plus, d'abord dans un bain-marie à 37° pendant quelques minutes, en les agitant de temps en temps de manière à leur faire prendre rapidement la température de 37°). On maintient ces laits à 37° pendant 8 heures sans précautions spéciales. Au bout de 8 heures on prend l'acidité de l'échantillon le plus important et on prélève, très aseptiquement, 1 cm³ de chacun de ces récipients qu'on introduit dans autant de fioles contenant chacune 100 cm³ d'eau peptonée stérile (et non pas en tubes de 10 cm³ pour les raisons indiquées). On procède ensuite à l'isolement et à l'identification du *B. Coli* dans les repiquages (voir plus loin).

2. CAS DE QUANTITÉS IMPORTANTES DE *B. COLI*. — Le principe à appliquer est toujours le même : les volumes prélevés, s'ils contiennent au moins 1 germe de *B. Coli*, donneront des résultats positifs ; ceux qui donneront des résultats négatifs seront considérés comme ne renfermant pas de *B. Coli* avant l'analyse ; mais, dans tous les cas, il faut que le *coli* soit mis en état de proliférer suffisamment pour donner des produits de réaction identifiables ou permettre des repiquages positifs après enrichissement.

Quels volumes prélever ? Nous estimons que, pour l'étude d'un lait courant, il est très suffisant de savoir si sa teneur en *B. Coli* au litre est comprise dans les intervalles suivants : 500, 1.000, 5.000, 10.000, 50.000, 100.000 ou plus..., ce qui correspond à présence ou absence de *B. Coli* sur 2 cm³, 1 cm³, 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 de centimètre cube. Les teneurs égales et inférieures à 100 germes au litre sont recherchées par incubation préalable du lait. Quelle que soit la méthode qui sera appliquée pour l'isolement ou l'identification, il faut que le ou les germes présents dans ces volumes de lait soient mis en état de proliférer abondamment. Il faut donc éviter, avons-nous dit, d'introduire ces prélèvements dans des volumes de milieu nutritifs tels que la concentration du lait y dépasse 1 ou 2 %. Les prélèvements de 2 et 1 cm³ seront donc introduits chacun dans une fiole de 100 cm³ d'eau peptonée. Les prélèvements inférieurs à 1 cm³ seront introduits dans des tubes de 10 cm³ d'eau peptonée. On porte le tout à l'étuve et on procédera ensuite à l'isolement et à l'identification.

Remarque : Les opérations précédentes n'ont eu pour but que de fractionner l'échantillon en volumes différents pour se donner une

base de numération, et d'y faire proliférer le *B. Coli* soit par incubation spontanée pour les gros volumes, soit par ensemencement convenable en milieu liquide pour les petits volumes. Nous savons maintenant que le *B. Coli* aura proliféré abondamment dans tous les cas, puisque nos recherches précédentes nous ont appris que même en présence de ferments lactiques très abondants :

1° Le *coli* se sera sûrement développé dans les tubes d'eau peptonée ;

2° Dans le cas des incubations des gros volumes, les repiquages de 1 cm³ seront sûrement positifs (sauf dans le cas de moins de 20 *coli* au litre où il y a lieu de discuter le résultat en fonction de l'acidité finale de l'échantillon incubé).

Au point de vue de la technique, ces incubations suivies de repiquages, sûrement positifs s'il y avait au moins un germe de *coli* dans le volume prélevé au départ, reviennent, en somme, à réaliser une sorte de concentration du *coli* éventuellement présent sous le volume maniable de 1 cm³ qui sera désormais traité comme un simple prélèvement de 1 cm³ sur le lait initial.

§ 2.

ISOLEMENT DU *B. COLI*

Nous sommes donc en possession :

De 4 ou 5 fioles de 100 cm³ contenant les repiquages de 1 cm³ des 4 ou 5 gros échantillons soumis à l'incubation ;

De 2 fioles de 100 et de 4 tubes de 10 contenant les ensemencements directs des petits volumes de lait.

Théoriquement, nous devrions isoler le *B. Coli* de toutes ces cultures par passage en milieux sélectifs, puis milieux solides, et terminer par l'identification. En fait, il n'est pas nécessaire d'entreprendre ce gros travail et nous avons depuis longtemps adopté un artifice de technique qui simplifie grandement les choses. Nous devons, pour l'expliquer, faire une anticipation sur le paragraphe de l'identification.

Quelles sont les réactions d'identifications auxquelles nous pourrions avoir recours dans le cas de *B. Coli* ? Il faut, on le sait, réunir un certain nombre de caractères qui sont les suivants :

1° Acidification et coagulation du lait ;

2° Réduction du rouge neutre ;

3° Production de gaz en milieux sucrés ;

4° Production de l'indol en milieux peptonés.

Notons que les caractères morphologiques et de coloration ne

peuvent servir que de *confirmation* et non d'identification véritable en raison de la non spécificité de ces caractères.

Les quatre propriétés chimiques principales du *B. Coli* rappelées ci-dessus sont loin, elles aussi, d'être spécifiques. Les trois premières surtout sont communes à *de nombreux germes courants* qui se rencontrent fréquemment dans le lait (1). La réaction de l'indol, en revanche, est limitée à un nombre de germes beaucoup plus restreint, dont quelques-uns sont d'ailleurs pathogènes ; parmi les germes banaux qu'on rencontre fréquemment dans le lait et qui donnent de l'indol, le plus courant à côté du *B. Coli* est le *proteus vulgaris*, d'ailleurs moins abondant et moins constant que le *B. Coli*. Nous pensons donc qu'avant d'aller plus loin dans l'examen de nos cultures, nous avons un procédé de triage commode par la réaction de l'indol. Toutes les cultures où il ne se sera pas formé d'indol dans un temps suffisant *pourront être éliminées comme n'ayant pas renfermé de B. Coli*. L'application des autres caractères chimiques à ce triage est évidemment d'un rendement bien moins bon, car les cultures à éliminer seraient souvent très peu nombreuses.

Les fioles qui auront donné la réaction de l'indol — dans les conditions fixées ci-après — contiennent donc soit du *B. Coli*, soit du *proteus vulgaris* *principalement*. Il faut isoler le *B. Coli* lui-même dans les cultures indol-positives. Mais le triage préalable facilite singulièrement le travail, car, *dans une série indol-positive, il suffit évidemment d'isoler le B. Coli de la culture correspondant au plus petit volume*. Si 1 cm³ de lait contenait du *B. Coli*, il est inutile de l'isoler sur les cultures de 2 ou de 10 cm³ qui en contiennent sûrement. L'essentiel est de travailler correctement sur la culture « frontale » de la série positive dont dépendra le résultat de la numération. Par précaution, on poussera l'étude à la culture positive voisine ; mais il est *fort rare*, pour ne pas dire tout à fait exceptionnel, qu'une culture soit indol-positive grâce au *proteus*, en l'absence de *B. Coli*. Quand le *proteus* est présent, le *coli* l'est toujours et bien souvent en quantités très supérieures. Donc, avant de procéder à l'isolement du *B. Coli*, nos cultures auront été triées par la réaction de l'indol effectuée après 24 heures d'étuve. Il est inutile d'attendre plus longtemps si on utilise la réaction d'Ehrlich-Kovacs qui décele fidèlement l'indol dès le premier jour d'une culture même très pauvre (voir plus loin). Une culture indol-négative, après 24 heures d'étuve, ne nous a jamais révélé d'indol même après 8 jours. Tout au plus une

(1) La réduction du rouge neutre et production de fluorescence, recommandée par VASSILEFF (*Le Lait*, mars 1932) comme « procédé d'évaluation du degré de pollution d'un lait » n'a pas la spécificité que certains auteurs ont voulu lui attribuer. VASSILEFF lui-même rappelle qu'une vingtaine de germes, dont quelques-uns très répandus dans la nature, présentent ces caractères.

réaction un peu douteuse le premier jour peut être refaite sur le reste de la culture 24 heures plus tard.

Ce triage opéré, il nous reste à isoler le *B. Coli* sur une ou deux cultures « frontales » de la série indol-positive. En principe, on pourrait s'adresser à une méthode classique quelconque en adoptant un des nombreux milieux de sélection proposés pour le *B. Coli*. La méthode la plus simple et la plus sûre est le passage en eau peptonée phéniquée (procédé de VINCENT). Phéniquée à 1 ‰, l'eau peptonée arrête particulièrement bien le *proteus vulgaris*. Elle arrête mal le *subtilis* et beaucoup de ferments lactiques ; nous ne réalisons donc pas un isolement strict, mais une sélection. L'essentiel est que le *proteus* soit empêché à cause de sa propriété indologène commune au *B. Coli*. Les autres milieux sélectifs ont été pour la plupart établis pour distinguer le *coli* du typhique, mais laissent passer de très nombreux autres germes du lait, et nous ignorons si leur action est certaine sur le *proteus* dont il faut ici se débarrasser.

La pratique nous a appris que le milieu de VINCENT, milieu de choix pour la recherche du B. Coli dans l'eau, devait être préféré aux autres également pour le lait.

Une question alors se pose immédiatement : pourquoi n'avons-nous pas phéniqué *directement* nos milieux d'enrichissement : eaux peptonées d'ensemencement et lait soumis à l'incubation spontanée ? Nous nous serions du même coup débarrassés du *proteus* et, en partie, des lactiques. La réponse est facile à faire : le phénol à 1 ‰, qui procure une sélectivité relativement grande, gêne assez nettement la prolifération du *B. Coli*. Quand celui-ci est apporté en abondance dans le milieu de sélection, on ne se rend pas compte du ralentissement subi et la prolifération, toujours si rapide du *B. Coli*, masque le phénomène. Mais quand on n'introduit que des traces de *B. Coli*, on s'aperçoit nettement du retard à la prolifération. En particulier, si le *B. Coli* est de l'ordre de quelques unités dans la culture à l'ensemencement, la réaction de l'indol qui apparaît nettement en 24 heures en eau peptonée pure (avec l'Ehrlich-Kovacs) n'apparaît que *quelques jours plus tard* en eau peptonée phéniquée.

Ce phénomène pourrait s'interpréter de bien des façons. Mais nous avons nettement observé que :

1° Le phénol présent ne gêne pas la *réaction* de l'indol (une quantité connue d'indol donne la même coloration, qu'il y ait ou non du phénol dans la liqueur, et cela est encore vrai avec 2 ‰ de phénol.)

2° Le phénol ne détruit pas l'indol formé, même après plusieurs jours de contact à 37°.

3° Les numérations de *coli* avant et après cultures en eau pep-

tonée phéniquée ou non, accusent nettement un retard dans la prolifération en milieu phéniqué.

Donc en phéniquant nos laits pendant leur incubation, ou nos milieux d'ensemencement, nous pouvions courir le risque de ne pas avoir une prolifération suffisante pour avoir des repiquages positifs. Nous aurions pu prolonger l'incubation. Mais les lactiques ne sont pas suffisamment arrêtés (tant s'en faut) par le phénol ; en effet : l'acidification spontanée de laits ou de solutions d'eau peptonée chargée de lait, n'est pratiquement pas retardée ni en quantité, ni en rapidité par la présence de 1 ‰ de phénol. La présence de phénol dans les incubations ou les ensemencements directs aurait donc eu pour résultat de retarder la prolifération du *B. Coli*, donc d'exiger de plus longs séjours, sans pouvoir, dans ce cas, nous protéger contre la production d'acidité due aux lactiques, ce qui, comme on le sait, eût été défavorable (sauf dans le cas des volumes très faibles correspondant aux laits très chargés). En utilisant le phénol dans ces conditions on eût donc risqué de *décaler*, dans la série des cultures, l'apparition de l'indol et de donner une numération fausse, péchant toujours par défaut. Par conséquent, c'était pour nous une nécessité que d'opérer comme nous l'avons fait, et la suite des opérations doit bien être la suivante :

- 1° Incubation ou ensemencement direct en eau peptonée pure ;
- 2° Ensemencement des laits incubés en eau peptonée pure ;
- 3° Réaction de l'indol après 24 heures de culture ;
- 4° Repiquage des cultures indol-positives en eau peptonée phéniquée pour éliminer les germes indologènes autres que le *coli*.

Nous sommes maintenant en possession d'une ou deux cultures au maximum, indol-positives, purifiées par un passage en Vincent. Théoriquement, il faudrait isoler complètement le *B. Coli* et l'identifier. Pratiquement, la chose est totalement inutile : le *proteus* étant éliminé par le passage en milieu phéniqué, il suffira de faire à nouveau la réaction de l'indol sur un nouveau et dernier repiquage en eau peptonée ordinaire pour avoir une conviction suffisante de la réalité de la présence du *B. Coli* (1).

Nous avons effectivement assisté, rarement d'ailleurs, à un décalage de la culture « frontale » de la série positive après le Vincent : cas où le *proteus* était plus abondant que le *coli*. Mais ce cas, qu'il fallait envisager, est exceptionnel, car le *proteus* paraît être encore plus sensible que le *B. Coli* à l'action de l'acide lactique produit par

(1) Il est bien entendu que, pour une recherche rigoureuse, il faudrait aller plus loin, particulièrement dans le cas où on redouterait la présence du *Vibron* du choléra, du bacille de la diphtérie, du tétragène, qui sont également indologènes, mais vraisemblablement fort rares dans le lait.

les autres germes présents et la sélection doit souvent s'opérer avant même le repiquage en Vincent. Quoi qu'il en soit, il suffira de faire le passage en Vincent d'une durée de 24 heures, ce qui permettra assez souvent de faire directement la réaction de l'indol dans le milieu phéniqué lui-même.

Nous avons dit que des traces de *coli* étaient gênées par le phénol. Mais n'oublions pas que, dans le Vincent, nous introduisons une culture de *B. Coli fort riche* provenant d'une culture de 24 heures en eau peptonée toujours chargée, même avec peu de germes au départ. Le phénol retarde certainement le *coli*, mais ne l'empêche pas de donner de l'indol (vérifié) et bien souvent la réaction d'Ehrlich-Kovacs peut être faite sur le Vincent de 24 heures. En cas de doute ou de réaction négative, il faut évidemment repiquer en eau peptonée ordinaire et faire l'indol sur cette dernière culture. Cette méthode se résume donc à faire, après les enrichissements, 2 réactions de l'indol séparées par un passage en Vincent et éventuellement une dernière réaction sur repiquage en eau peptonée simple.

§ 2 bis.

NOTE SUR L'ISOLEMENT DU *B. COLI* SUR MILIEUX SOLIDES DE SÉLECTION

Dans le contrôle courant, la réaction de l'indol (après un passage en Vincent qui élimine le *proteus*) est suffisamment spécifique pour qu'il soit inutile d'aller plus loin dans l'identification du *B. Coli*. Pour des recherches spéciales ou en cas de contestation il sera nécessaire d'isoler le *coli* sur milieu solide pour refaire l'indol, d'autres réactions chimiques, l'examen microscopique, etc... sur une colonie pure. Il existe beaucoup de milieux solides de sélection.

La plupart ne sont pas assez sévères et laissent passer beaucoup d'autres germes que le *B. Coli*; en particulier ceux qui sont utilisés en bactériologie médicale rendent peu de services en bactériologie laitière, à cause de la présence dans le lait, en quantités abondantes, de germes qui traversent même le Vincent et poussent bien sur milieux solides phéniqués du type Chantemesse et Widal. Nous avons à cet égard entrepris des recherches qui nous ont permis d'établir quelques formules de milieux de sélection très peu favorables aux ferments lactiques ou même complètement défavorables.

Les meilleurs résultats ont été obtenus d'une part avec les milieux gélosés au bouillon d'artichaut très défavorables aux lactiques et très favorables au *B. Coli*, d'autre part avec des milieux gélosés à azote purement minéral (gélose au sulfate d'ammoniaque) où le *coli* pousse assez difficilement, mais où les lactiques et beaucoup d'autres germes sont rigoureusement empêchés. Les colonies de

B. Coli sur gélose au sulfate d'ammoniaque sont petites, mais toujours très pures. Nous croyons que, sous réserve de recherches complémentaires, on dispose avec ce milieu d'un filtre très sévère permettant l'isolement du *B. Coli*. Ces deux milieux se préparent très simplement en gélosant soit du bouillon d'artichaut ordinaire, soit une solution aqueuse de sulfate d'ammoniaque à 10 gr. par litre.

Notons aussi en passant que l'addition d'iodure de potassium ou de sodium au bouillon d'artichaut gélosé augmente encore la sélectivité. L'addition de peptone favorise le *B. Coli*, mais diminue d'autant la sélectivité dans tous les cas.

Les colonies de *B. Coli* étant isolées et repiquées, l'identification de ce microbe est facile (examen microscopique, Gram, fermentation des sucres, décoloration du rouge neutre, indol...).

§ 3.

IDENTIFICATION DU *B. COLI* — ÉTUDE DE LA RÉACTION DE L'INDOL

Avant de résumer les techniques précédentes et de leur donner leur forme pratique définitive, il nous faut dire quelques mots de la réaction de l'indol que nous avons particulièrement étudiée. Nous ne ferons pas la théorie des réactions classiques qui permettent de caractériser l'indol. On la trouve dans les traités de chimie organique ou de chimie biologique un peu complets. Parmi ces réactions la plus sensible à beaucoup près et la plus sûre, est la formation d'une coloration rouge sous l'action de la paradiméthylaminobenzaldéhyde en milieu chlorhydrique connue sous le nom de réaction d'Ehrlich. C'est elle que nous avons adoptée pour tous nos travaux sur le *B. Coli*. Nous la pratiquons quotidiennement depuis trois ans avec le plus grand profit.

Étudions-la succinctement au point de vue pratique.

1° Réactif initial d'Ehrlich. — Sa composition est la suivante :

Paradiméthylaminobenzaldéhyde	4 gr.
Alcool éthylique à 95°	400 cm ³
Acide chlorhydrique pur	70 cm ³

2° Pratique de la réaction. Critiques. — Une culture contenant de l'indol est additionnée de ce réactif, à froid. Il se forme immédiatement (ou en quelques minutes dans le cas de traces) une coloration rose ou rouge dans la masse du mélange homogène. On a le plus grand intérêt à ajouter de l'alcool amylique pour rassembler la teinte dans un petit volume et aussi pour lever le doute qui surgit souvent, car l'acide chlorhydrique réagit sur certains composants de la culture et donne une coloration rougeâtre (non séparable à

l'alcool amylique) et qui, sans cette précaution, pourrait être confondue avec la réaction de l'indol. Les conditions optima sont les suivantes : mélanger un volume égal de culture et de réactif. Si on utilise moins de réactif on diminue la sensibilité ; si on dépasse l'égalité des volumes on n'augmente plus la sensibilité. Toutefois un inconvénient surgit : à l'optimum, la quantité d'alcool amylique nécessaire pour avoir une séparation nette, est relativement élevée, ce qui diminue à nouveau la sensibilité. Cet inconvénient disparaît en utilisant l'heureuse modification due à Kovacs (ci-après).

L'addition de persulfate de potassium, qui a été recommandée, augmente un peu la coloration produite. Le maximum de teinte est alors obtenu un peu plus tard (10 minutes environ), mais nous avons constaté qu'il n'y a pas à proprement parler d'augmentation de sensibilité. Il y a un léger changement de la coloration (qui devient plus rouge vif). Mais avec des traces d'indol cette amélioration est insignifiante et la limite inférieure de la détection n'est pratiquement pas modifiée. Nous avons abandonné l'usage du persulfate depuis longtemps.

3° Réactif d'Ehrlich-Kovacs. — On dissout 5 gr. de para-diméthylaminobenzaldehyde broyée au mortier dans 75 cm³ d'alcool amylique. On ajoute aussitôt après la dissolution, qui est rapide, 25 cm³ d'acide chlorhydrique pur. Ce réactif a remplacé l'alcool éthylique par l'alcool amylique qui joue en même temps le rôle d'agent d'extraction de la coloration. Il est plus onéreux que le précédent. Mais nous avons constaté qu'en n'employant que 2 gr. 5 de benzaldéhyde (toutes choses égales d'ailleurs) on obtient un réactif aussi bon que celui de Kovacs et moins coûteux. Si on diluait davantage, on atténuerait la sensibilité de la réaction.

4° Mode opératoire. — Ici l'optimum de la réaction n'exige plus des volumes égaux de culture et de réactif, ce qui est fort avantageux. La réaction est toujours instantanée moyennant une agitation très légère. L'alcool amylique coloré en rouge vif se sépare avec une remarquable netteté.

Les conditions optima sont les suivantes :

5 cm³ de culture sont additionnés de 2 à 3 cm³ de réactif ; la chute du réactif produit une agitation en général suffisante.

5° Sensibilité de la réaction d'Ehrlich-Kovacs. — Elle est véritablement extraordinaire. Elle est 15 fois plus grande que celle de la réaction au nitrite de soude. Avec quelques millièmes de milligramme d'indol dans 5 cm³ de culture on obtient encore une coloration nette (fleur de pêcher). On perçoit nettement la différence entre un tube contenant 2 et un autre contenant 4 millièmes de mgr.

La limite inférieure perceptible est de l'ordre de 0 mgr. 001. Les eaux peptonées que nous employons (peptone Defresne) ne donnent absolument aucune coloration dans l'alcool amylique qui se sépare dans la réaction. Cette grande sensibilité n'est donc pas une gêne, ni un danger.

Aussi est-il inutile de souligner la netteté et la beauté des colorations rouge intense qu'on obtient dans les cultures contenant même de petites quantités d'indol. Des tubes de 10ensemencés avec des volumes d'une dilution de *B. Coli* telle qu'on espère n'introduire qu'un seul germe, donnent, après 24 heures d'étuve, soit des réactions négatives, sans ambiguïté, soit des réactions fortement positives pour des quantités de *coli* initiales de l'ordre de 1 germe. Autrement dit, l'Ehrlich-Kovacs ne donne pour ainsi dire jamais de réactions douteuses dans la pratique de la recherche du *B. Coli* : les colorations roses qu'on produit avec des traces d'indol introduites artificiellement n'apparaissent jamais dans un contrôle de culture qui se trouve toujours contenir beaucoup plus que quelques millièmes de milligramme d'indol. Nous n'avons jamais noté de coloration rouge avec ce réactif dans des cultures de germes non indologènes, ou dans des eaux peptonées stériles. La réaction nous paraît tout à fait sûre. Il arrive souvent en revanche que la liqueur aqueuse sous-jacente se colore en rose sous l'action de l'acide chlorhydrique contenu dans le réactif. Cette coloration qui se produit au sein des colloïdes azotés de la culture (protéines) est insoluble dans l'alcool amylique. Elle ne gêne jamais la réaction qui doit être observée *seulement* dans l'alcool amylique surnageant.

6° Remarques. — a) Le réactif d'Ehrlich-Kovacs, fraîchement préparé, est rose sous une certaine épaisseur. Cette coloration ne gêne pas pour la réaction, car, sous un centimètre d'épaisseur (tube à essais), elle est peu appréciable. Il est impossible de la confondre avec la coloration produite par une culture contenant de l'indol. D'ailleurs, cette coloration rose disparaît en quelques jours si on a soin de conserver le réactif dans un flacon débouché. La coloration rose vire au jaune clair et ne gêne plus du tout.

b) Quand on étudie la réaction avec des traces d'indol apportées, on s'aperçoit que le chauffage du mélange (solution d'indol + réactif) augmente la sensibilité. Une ébullition de quelques secondes y suffit. Mais pour le contrôle d'une culture cette précaution est *inutile*.

En résumé :

- a) Nous conseillons l'adoption du réactif d'Ehrlich-Kovacs :
Paradiméthylaminobenzaldehyde, 5 gr. ou 2 gr. 5 ;
Alcool amylique, 75 cm³ ;

et après dissolution à froid : HCl pur, 25 cm³.

b) Ajouter à 5 ou 10 cm³ de culture, 2 à 3 cm³ de réactif, sans chercher à agiter violemment.

c) La réaction est instantanée ; il se produit toujours, dans une culture de *B. Coli* de 24 heures si faible qu'ait été la dose de *B. Coli* introduit, une coloration rouge vif dans l'alcool amylique qui surnage. La réaction est spécifique de l'indol et ne donne rien avec l'eau peptonée stérile ouensemencée de germes non indologènes.

(Nous ne ferons ici aucune étude spéciale des autres caractères d'identification du *B. Coli* : gram négatif, fermentation des sucres, décoloration du rouge neutre, etc., qui sont du domaine de la pratique bactériologique courante et ne présentent aucune difficulté.)

* * *

MODE OPÉRATOIRE PROPOSÉ POUR LA RECHERCHE ET LA NUMÉRATION DU *B. COLI* DANS LE LAIT INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS DE L'ANALYSE

1^{er} Temps. Enrichissement des prélèvements différentiels.

Première série de prélèvements. — On prélève aseptiquement 10, 20, 50, 100 cm³ de lait qu'on introduit dans autant de fioles vides stériles. Il est bon, si on le peut, de prélever également un litre de lait environ. Tous les prélèvements (4 ou 5) sont mis à incuber 8 heures à l'étuve à 37° après avoir eu soin de réchauffer rapidement au bain-marie à 37° les volumes supérieurs à 50 cm³. Après 8 heures d'incubation, on prend l'acidité du lait aseptiquement sur un seul échantillon et on repique 1 cm³ de toutes les fioles dans autant de fioles de 100 cm³ d'eau peptonée (1) (fioles série A).

Deuxième série de prélèvements. — On prélève aseptiquement sur le lait initial soumis à l'analyse 1 et 2 cm³ de lait qu'on introduit dans 2 fioles de 100 cm³ d'eau peptonée (fioles série B). On prélève également 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 de lait qu'on introduit dans autant de tubes de 10 cm³ d'eau peptonée ordinaire (tubes série B). Dans le cas de laits courants du commerce on peut se contenter de la 2^e série de prélèvements ; dans le cas de laits sortant de pasteurisateurs ou de laits supposés très purs, la 1^{re} série de prélèvements est nécessaire ; dans le cas d'un lait totalement inconnu les 2 séries sont nécessaires.

2^e Temps. Elimination des repiquages exempts de

(1) Composition de l'eau peptonée :	Eau distillée q. s. p.	1.000 cc.
	Peptone Defresne ..	20 gr.
	Chlorure de sodium.	5 gr.

B. Coli. — Les 4 ou 5 fioles série A, les 2 fioles série B et les 4 tubes série B sont maintenus 24 heures à 37°. Au bout de ce temps on fait la réaction de l'indol sur un prélèvement aseptique des cultures dans les conditions qui ont été indiquées.

Toutes les cultures donnant une réaction négative sont éliminées.

Et, de toute la série des cultures indol positives, on ne conserve que celles qui correspondent aux 2 doses les plus faibles de lait mis en œuvre.

Exemple :

Supposons qu'on ait le résultat suivant sur la série des cultures :

- N° 1 provenant de 1.000 cm³ de lait, réaction de l'indol : positive.
- N° 2 provenant de 100 cm³ de lait, réaction de l'indol : positive.
- N° 3 provenant de 50 cm³ de lait, réaction de l'indol : positive.
- N° 4 provenant de 20 cm³ de lait, réaction de l'indol : *positive*.
- N° 5 provenant de 10 cm³ de lait, réaction de l'indol : *positive*.
- N° 6 provenant de 2 cm³ de lait, réaction de l'indol : négative.
- N° 7 provenant de 1 cm³ de lait, réaction de l'indol : négative.
- N° 8 provenant de 1/5 cm³ de lait, réaction de l'indol : négative.
- N° 9 provenant de 1/10 cm³ de lait, réaction de l'indol : négative.
- N° 10 provenant de 1/50 cm³ de lait, réaction de l'indol : négative.
- N° 11 provenant de 1/100 cm³ de lait, réaction de l'indol : négative.

Dans ce cas on ne conserve que les cultures n°s 4 et 5.

3^e Temps. Purification des cultures conservées. — Elimination des germes indologènes autres que le B. Coli. — Les deux cultures indol positives conservées sont repiquées à raison de 1 cm³ dans 10 cm³ d'eau peptonée phéniquée à 1 pour mille. On maintient 24 heures à l'étuve à 37°.

4^e Temps. Identification du B. Coli. — La réaction de l'indol est refaite à l'issue de ces 24 heures sur une portion des cultures en milieu phéniqué. Si la réaction est positive sur les 2 tubes la cause est entendue ; les cultures initiales contenaient du *B. Coli* et le résultat de la numération indique : au moins un germe de *B. Coli* dans 10 cm³ de lait et pas de *B. Coli* sur 2 cm³, c'est-à-dire, quantité comprise entre 100 et 500 au litre.

Si l'une de ces cultures est indol-négative sur le milieu phéniqué (et à plus forte raison si les 2 le sont) on repique une dernière fois à raison de 1 cm³ dans 10 cm³ d'eau peptonée ordinaire et on refait l'indol après 24 heures d'étuve. Si les 2 réactions sont positives la conclusion est la même que dans le cas précédent. Il arrive que la réaction de l'indol n'apparaisse que sur ce deuxième repiquage ; l'indol-négatif sur le milieu phéniqué lui-même ne signifie nullement absence de *coli*. Si le repiquage n° 5 est négatif avec le n° 4 positif, la dose de *B. Coli* dans le lait initial est évidemment comprise 50 et

100 individus au litre. Ce cas des cultures indol-positives avant le Vincent et négatives ensuite est assez rare et correspond à une prédominance du *Proteus vulgaris* dans le lait. Il arrive même quelquefois, il faut l'avouer, qu'on ait par exemple des cultures n° 4 négatives avec des cultures n° 5 positives. Cette anomalie provient de l'hétérogénéité de la répartition du *B. Coli* dans le lait au départ. Elle est de nature à nuire évidemment à la précision du résultat obtenu. Mais elle est assez rare dans la pratique, surtout si on a eu soin de bien agiter l'échantillon avant les prélèvements. (Notons en passant qu'elle pourrait aussi provenir d'une infection accidentelle des cultures n° 5, due à une faute de technique.)

Ces réactions de l'indol sur les dernières cultures après passage en Vincent suffisent dans la pratique laitière courante à identifier le *B. Coli*. Si on désire une plus grande sécurité dans les conclusions il sera facile de l'isoler sur milieu solide sélectif : Chantemesse, par exemple, ou mieux bouillon d'artichaut gélosé, ou gélose au sulfate d'ammoniaque. Les colonies de *B. Coli* extraites sur ces milieux, repassées en eau peptonée, permettront ensuite de mettre en évidence les caractères morphologiques et biochimiques de *B. Coli*.

5^e Temps. Interprétation des résultats dans le cas de traces de *B. Coli*. — Pour tous les prélèvements initiaux égaux ou inférieurs à 20 cm³ de lait, les conclusions tirées de l'examen de la réaction de l'indol dans les derniers repiquages ne souffrent aucune difficulté. Tout résultat final positif correspond à au moins 1 germe dans le volume prélevé (exemple : moins de 50 *coli* au litre, dans le cas de résultat négatif à partir de la culture n° 4 correspondant à 20 cm³ de lait initial).

Pour les cultures provenant de l'incubation spontanée de 50, 100 ou 1.000 cm³ de lait, une distinction s'impose : Tout résultat final positif correspond bien, dans tous les cas, à au moins 1 germe de *B. Coli* dans le volume mis en œuvre. Mais tout résultat négatif ne correspond pas nécessairement à moins de 1 germe dans ce volume.

L'acidité titrée en fin d'incubation doit ici intervenir. Si l'acidité a dépassé 55° Dornic environ, un résultat final négatif signifie qu'il y avait, au départ, moins de 20 *B. Coli* dans le litre incubé (ou moins de 2 dans les 100 cm³), sans qu'on puisse préciser davantage. Or cette absence de précision peut être fort gênante pour l'appréciation d'un lait sortant d'un pasteurisateur où la présence de 10 ou 20 *B. Coli* au litre est certainement un mauvais indice. Si l'acidité n'a pas dépassé 55° Dornic, un résultat final négatif renseigne davantage : il signifie qu'on avait moins de 10 *B. Coli* dans le litre mis à l'étuve (ou néant sur les 100 cm³). Si enfin l'acidité n'a pas monté du tout, un résultat final négatif signifie absence complète de *B. Coli* dans l'échantillon soumis à l'analyse, même s'il s'agit du litre entier.

Ces quelques réserves qui ont leur importance dans l'étude des laits ne devant pas contenir de *B. Coli* (à la sortie d'un pasteurisateur par exemple) sont évidemment sans intérêt dès que le lait contient plus de 50 *coli* au litre.

Mais nos recherches ont eu précisément pour but, en délimitant la portée de nos réserves, de montrer que l'incubation avec forte acidification du lait ne risque d'influencer l'interprétation de l'analyse, que dans les cas où le lait contient moins de 20 B. Coli au litre.

RÉSUMÉ DU MODE OPÉRATOIRE

1° Faire les prélèvements suivants : 1.000 cm³, 50 cm³, 20 cm³, 10 cm³ qu'on met à incuber à l'étuve pendant 8 heures. Prendre l'acidité d'une fiole après 8 heures et repiquer 1 cm³ de chaque dans 100 d'eau peptonée ordinaire. Introduire également en temps initial 2 cm³, 1 cm³ dans des fioles de 100 cm³ d'eau peptonée et 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 de cm³ de lait dans des tubes de 10 d'eau peptonée ordinaire.

2° Après 24 heures d'étuve, faire l'indol sur toutes ces eaux peptonées. Eliminer toutes les cultures négatives. Repiquer en eau peptonée phéniquée à 1‰ les 2 cultures positives correspondant aux plus petits volumes initiaux.

3° Faire l'indol 24 heures après sur ces 2 cultures en milieu phéniqué. Si les résultats sont positifs l'analyse est terminée. Si l'une des cultures (ou les deux) est négative repiquer en eau peptonée ordinaire (1 cm³ dans 10).

4° Refaire une dernière fois l'indol sur ces repiquages éventuels après 24 heures d'étuve. Le résultat est définitif et permet de traduire la numération.

5° Dans le cas de résultats finaux négatifs correspondants aux volumes initiaux de 50, 100 ou 1.000 cm³ de lait, tenir compte pour l'interprétation de l'acidité obtenue en fin d'incubation. Si celle-ci est $> 55^{\circ}$, les résultats négatifs ne peuvent signifier que : « moins de 20 *coli* au litre ». Si celle-ci est $< 55^{\circ}$, les résultats négatifs peuvent signifier « moins de 10 *coli* au litre » ; si elle est la même que sur le lait initial ($\leq 18^{\circ}$ Dornic par exemple), ces résultats négatifs peuvent s'interpréter comme « absence totale de *coli* dans un litre de lait ».

* * *

RÉSUMÉ GÉNÉRAL ET CONCLUSIONS DE NOTRE ÉTUDE SUR LA RECHERCHE DU *B. COLI* DANS LE LAIT

1° **Teneur approximative des laits en colibacilles :** Dans les laits crus on peut avoir plusieurs centaines de milliers et même

plusieurs millions de colibacilles au litre ; dans les laits pasteurisés il ne doit pas y avoir de *B. Coli* au sortir des appareils si la température est d'au moins 65° pendant trente minutes ; si le prélèvement est fait au moment de la vente on trouve, par suite de réinfections, de 10.000 à 100.000 *coli* au litre sauf dans certains laits particulièrement bien traités et vendus en récipients clos.

2° Intérêt de la recherche du *B. Coli* dans le lait : Il est basé sur des raisons d'ordre hygiénique et d'ordre industriel. *Au point de vue de l'hygiène* nous estimons qu'il n'y a pas de raison sérieuse de penser que les colibacilles qui souillent le lait puissent avoir une signification qualitative profondément différente de ceux qui souillent les eaux. *Au point de vue industriel*, la recherche du *coli* dans le lait sortant des appareils de pasteurisation est un élément de contrôle autrement précieux et significatif qu'une simple numération de germes.

3° De la sensibilité à exiger de la recherche du *B. Coli* dans le lait : Après la signification qualitative, la signification quantitative : *au point de vue de l'hygiène* le problème est loin d'être résolu ; on peut considérer comme les plus parfaits des laits qui contiennent moins de 50 *coli* au litre ; comme très bons ou bons (en tout cas supérieurs à la moyenne des laits de grosse vente courante) ceux qui contiennent de 100 à 1.000 *coli* au litre ; comme laits courants ceux qui contiennent plus de 1.000 *coli* au litre... *Au point de vue industriel*, on doit se montrer plus sévère, car un lait provenant d'une pasteurisation bien faite et suffisante ne doit pas contenir de *B. Coli*.

Aussi la recherche du *B. Coli* telle qu'on la fait d'ordinaire sur 1 cm³ (ou une fraction de centimètre cube) est tout à fait insuffisante. Il faut pouvoir atteindre de plus grandes sensibilités. Il faut pouvoir opérer la recherche sur de gros volumes de lait (50, 100 cm³..., voire un litre). Or cette opération présente de grosses difficultés techniques que nous nous sommes proposé de résoudre.

4° Idée d'une méthode par incubation. — La recherche de traces de *coli* sur de gros volumes de lait exige d'abord de faire proliférer abondamment ce germe, soit qu'on veuille l'identifier directement par ses produits de sécrétion, soit qu'on veuille le repiquer en fin d'incubation pour identification ultérieure.

5° Or il est impossible de produire dans le lait lui-même des produits d'identification spécifiques du *B. Coli*. — Nous avons montré que le *B. Coli* ne donne pas d'indol dans le lait, même en présence de peptone, et nous avons expliqué ce phénomène en démontrant que le lactose s'oppose à la production de l'indol par le *B. Coli*.

6° Il faut donc s'attacher à faire proliférer le *B. Coli* d'une manière suffisante au cours d'une incubation, pour qu'un repiquage d'un petit volume (1 cm³ par exemple) emporte certainement du *B. Coli* qu'on identifiera ensuite.

7° Les résultats de la prolifération du *B. Coli* en lait stérile à 37° sont les suivants. — Un germe initial, après 8 heures d'incubation, s'est multiplié par 20.000 à 40.000, condition largement suffisante pour qu'un germe au litre, au départ, permette des repiquages de 1 cm³ sûrement positifs.

Nous avons montré également que le temps nécessaire à une germination de *B. Coli* est de l'ordre de 30 à 50 minutes.

La prolifération du *B. Coli* en fonction du temps peut se représenter par des graphiques, si on a soin de porter en ordonnées, non pas le nombre de germes, mais les logarithmes de ces nombres à chaque instant (symbole « Lg »).

8° Ce qui est vrai du *B. Coli* seul en lait l'est-il encore en présence de ferments lactiques ? Il faut scinder l'étude en deux parties : étude de l'influence de l'acide lactique produit et étude de l'influence des corps microbiens des ferments lactiques (concurrence vitale).

9° Influence de l'acide lactique. — Nous avons montré que la prolifération du *B. Coli* en lait s'arrête en présence de 4 gr. d'acide lactique libre par litre (60° Dornic dans le lait). Dans l'eau peptonée, l'acidité empêchante n'est que de l'ordre de 1 gr. 5 par litre.

Si l'acide lactique est introduit dans le lait à doses croissantes pour reproduire l'acidification spontanée des laits à l'étuve, on s'aperçoit que la gêne à la prolifération ne s'exerce que dans le cas d'acidification très rapide et seulement en fin d'incubation. Mais dans tous ces cas d'acidification artificielle la prolifération du *B. Coli* en 8 heures à 37° est suffisante pour permettre des repiquages positifs de 1 cm³ en fin d'incubation.

10° L'étude de l'influence des corps microbiens des ferments lactiques (en l'absence d'acide lactique libre) sur la prolifération du *B. Coli* a posé plusieurs problèmes de technique que nous avons résolus (maintien de la constance de la réaction pendant l'incubation, choix et réalisation des quantités de *coli* et de lactiques à mettre en œuvre).

Les résultats obtenus nous montrent que la présence des ferments lactiques peut constituer dans une certaine mesure un obstacle à la prolifération du *B. Coli* : dans des laits où l'acide lactique ne peut apparaître, des doses de ferments lactiques de l'ordre de 200.000 à 900.000 au cm³ avec 10 à 20 germes de *B. Coli* au litre,

s'opposent à la prolifération de ce dernier d'une manière telle qu'un repiquage de 1 cm³ en fin d'incubation n'emportera pas de *coli*. Pour des doses de lactiques inférieures, les repiquages sont toujours positifs avec les mêmes petites quantités de *B. Coli*.

11° Dans la pratique, ces deux influences (acide lactique et ferments lactiques) se superposent. — Rien ne peut permettre de prédire que ces deux influences simultanées auront un résultat égal à la somme des deux influences séparées. Il faut expérimenter directement. La technique des modes opératoires a été indiquée. Les résultats sont les suivants : des traces de *B. Coli* mises à incuber dans du lait en présence de ferments lactiques ne donnent lieu, après 8 heures à 37°, à des repiquages de 1 cm³ positifs que si l'acidité finale est inférieure à 85° Dornic (cas de 20 *B. Coli* au litre au départ), inférieure à 60-65° Dornic (cas de 12-15 *B. Coli*), inférieure à 55-65° Dornic (cas de 7 à 10 *B. Coli*).

12° Les conditions de l'incubation en présence de lactiques sont donc connues. — Au-dessus de 20 germes de *B. Coli* au litre avant l'incubation, les repiquages de 1 cm³ après 8 heures d'étuve à 37° emportent toujours du *coli*. S'ils sont négatifs, il y avait moins de 20 *coli* au litre. On peut affirmer qu'il y en avait moins de 10 au litre si l'acidité n'est pas montée au-dessus de 55° Dornic. On peut affirmer qu'il n'y en avait pas du tout si l'acidité n'a pas monté.

13° On peut maintenant préconiser en connaissance de cause l'incubation comme méthode d'enrichissement dans le cas de traces de *B. Coli* et on sait interpréter les résultats. — On pourra donc établir un mode opératoire complet embrassant la recherche de toutes les doses, même les plus faibles, de *B. Coli* dans un lait quelconque.

14° Quelques autres questions ont dû être précisées pour servir à l'établissement de la méthode :

Il est très mauvais d'introduire par exemple 1 cm³ de lait dans 10 cm³ d'eau peptonée pour faire proliférer le *B. Coli*. Il ne faut pas dépasser la concentration de 1 à 2 % de lait dans l'eau peptonée. Faute de quoi on risque de ne pas retrouver le *B. Coli* présent. Nous en avons donné les raisons qui découlent de nos recherches antérieures.

Nous avons également insisté sur le moyen de se débarrasser des germes indologènes autres que le *coli* (*proteus vulgaris* principalement). Nous avons étudié en détail la réaction de l'indol et montré la supériorité du réactif d'Ehrlich-Kovaes, et indiqué, avec ses limites de sensibilité, le mode opératoire optimum à employer.

15° Tous ces travaux préparatoires nous ont finalement fourni les

éléments **d'une méthode générale de recherche et de numération du *B. Coli* dans le lait dans tous les cas possibles.** Cette méthode a été exposée en détail dans le présent article.

Nous croyons qu'elle pourra, par sa simplicité et sa rigueur, rendre quelques services dans l'étude bactériologique des laits et principalement des laits très purs et des laits sortant des pasteurisateurs industriels.

RECHERCHES SUR LA CASÉINE

par Mlle J. BRIGANDO

Docteur ès Sciences de l'Université de Lyon,
Chef de Travaux à l'Institut des Recherches Agronomiques.

(Suite.)

PRÉPARATION DE LA CASÉINE-ACIDE DANS L'INDUSTRIE

Nous allons maintenant nous occuper de la préparation de la caséine-acide industrielle. Toutefois nous tenons à rappeler comment on la prépare au laboratoire, afin de puiser dans la technique suivie les raisons d'une amélioration de la fabrication industrielle.

L'irrégularité de celle-ci est un fait bien connu sur le terrain commercial. La caséine est un sous-produit auquel on pense quand il y a un surplus de lait écrémé qui ne peut pas être utilisé dans l'alimentation humaine ou celle des animaux. La fabrication de la caséine-acide peut cependant être améliorée comme nous nous efforcerons de le montrer au cours de ce travail.

Dans les pages antérieures, nous nous sommes employée à marquer la différence profonde qui sépare la caséine-acide de la caséine-présure. Nous avons vu que l'acidification du lait en vue de l'obtention de la caséine-acide peut être réalisée de diverses façons ; nous pouvons laisser le lait s'acidifier spontanément ou bien ajouter un acide, en proportion donnée, et dans des conditions déterminées.

Dans ce chapitre, et afin d'éviter toute confusion, nous appellerons *caséine-lactique*, la caséine d'acidification spontanée, et *caséine-acide*, celle qui résulte de l'acidification provoquée par l'apport d'un acide minéral ou organique autre que l'acide lactique. Cette distinction est d'ordre industriel et elle est faite pour éviter des confusions de langage, car, théoriquement, on ne voit pas sur quoi elle peut se baser ; on pourrait très bien se servir d'acide lactique industriel pour précipiter la caséine du lait frais. On effectuerait ici l'apport d'un acide qui, habituellement, est préparé par les ferments lactiques, commensaux habituels du lait.

Les divers acides employés. — Les acides employés lors de