LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- T. MATUSZEWSKI, J. NEYMAN, E. PIJANOWSKI et M^{lle} J. SUPINSKA. — Une interprétation mathématique de l'épreuve de la réductase 1057
- A. FOURNIER. — Un coefficient de propreté du lait . . 1077
- S. TAUSSIG. — L'exactitude des différentes méthodes de contrôle laitier 1087

Revue :

- Pasteurisation du lait, ses avantages et ses inconvénients (méthode de pasteurisation basse) 1101

Bibliographie analytique :

- 1^o Les livres 1104
- 2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 1109
- 3^o Brevets 1140

Bulletin bibliographique :

- 1^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 1142
- 2^o Brevets 1147

Documents et informations :

- L'agriculture et l'économie dirigée (*fin*) 1148
- Congrès de printemps de l'American Chemical Society (avril 1935) 1151
- Assemblée sociale de la Société des éleveurs de Pavie (février 1935) 1154
- Beurre et acide borique . . . 1155
- La répression des fraudes au Maroc 1156
- Production de la margarine au Danemark 1156
- Relevé des déclarations de stocks de beurres conservés dans les entrepôts frigorifiques 1157
- Salon de la Machine agricole . 1157
- Table des matières 1158
- Table des auteurs 1173
- Table des ouvrages analysés . 1199

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

UNE INTERPRÉTATION MATHÉMATIQUE DE L'ÉPREUVE DE LA RÉDUCTASE

par

T. MATUSZEWSKI, J. NEYMAN, E. PIJANOWSKI et
M^{lle} J. SUPINSKA

de l'Ecole Centrale Agronomique à Varsovie.

BASES THÉORIQUES

L'épreuve de la réductase, comme un des moyens de l'appréciation hygiénique du lait, faisait dans les dernières années l'objet des recherches d'un assez grand nombre d'auteurs, tels que: DLUZEWSKI [5],

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

DORNER [6], PESCH et SIMMERT [13], THORNTON et HASTINGS [16]. Il résulte de ces expériences qu'on ne peut traiter l'épreuve de la réductase comme une méthode de l'estimation du nombre des bactéries dans le lait, parce que le temps de la décoloration dépend non seulement du nombre initial des germes du lait examiné, mais aussi du nombre des organismes qui ont été formés pendant l'épreuve, jusqu'au moment de la décoloration. Les capacités réductrices individuelles des cellules peuvent également exercer leur influence, d'où il résulte qu'entre le nombre des bactéries et le temps de la décoloration du bleu de méthylène, il n'y a qu'une relation de nature très complexe.

Ce n'est qu'après une interprétation spéciale de cette relation qu'on peut constater la vraie valeur de l'épreuve.

Ce travail a pour but une tentative de l'interprétation mathématique du processus de l'épreuve de la réductase et la confrontation de nos déductions théoriques avec les données expérimentales.

Désignons le nombre initial des cellules bactériennes contenues dans le lait par le symbole N_0 , le temps de la décoloration du BM par T . Il se pose une question : quelle est la relation entre ces deux variables ? Si, durant l'épreuve, les cellules ne se multipliaient pas, et si la capacité réductrice de chaque cellule était la même, nous aurions l'équation suivante :

$$N_0 b T = B, \quad (1)$$

où b — est la quantité du BM réduite dans l'unité de temps par une cellule et B désigne la quantité totale de la matière colorante. Il est facile de voir que cette équation est identique à la suivante, bien connue dans les recherches diastatiques :

$$\text{enzyme} \times \text{temps} = \text{constante} \quad (2)$$

parce que $N_0 b$ correspond ici à l'expression « Enzyme ». D'après LÖFFLER et RIGLER [10], qui s'appuyaient sur la technique expérimentale analogue à celle de THUNBERG [17], l'équation (1) peut être appliquée dans certaines limites de temps, en cas d'absence d'oxygène et en cas de présence de bactéries non proliférantes.

Dans les conditions normales de l'épreuve de la réductase dans le lait, les quantités d'oxygène toujours y contenues, ainsi que la multiplication suivante des microorganismes, doivent être prises en considération.

Il est connu que la vitesse de la multiplication des microorganismes n'est pas constante. Cependant, vu le fait que la disparition de la couleur du lait a lieu beaucoup plus tôt que le moment d'une saturation maxima par les cellules bactériennes, nous pouvons en conclure que, durant la plus grande partie de l'épreuve, les bactéries en question sont en phase logarithmique de la multiplication.

Supposons donc que : a) le nombre des cellules qui se multiplient pendant une unité de temps est proportionnel au nombre total des cellules présentes, K — étant le coefficient de proportionnalité ; b) que toute cellule réduit pendant une unité de temps la même quantité du BM, soit b . Cela aura lieu, si N_t et B_t désignent le nombre de cellules au moment t et la quantité du BM réduit jusqu'au moment t . Nous aurons donc :

$$\frac{dN_t}{dt} = KN_t \quad (3)$$

D'où on obtient

$$N_t = N_0 e^{Kt} \quad (4)$$

et, en particulier, si $t = T$,

$$N_T = N_0 e^{KT} \quad (5)$$

donc,

$$K = \frac{\log N_T - \log N_0}{T \log e} \quad (6)$$

Et ensuite :

$$\frac{dB_t}{dt} = bN_t = bN_0 e^{Kt}. \quad (7)$$

Si B désigne encore la quantité totale du BM additionné et T le temps de décoloration complète, nous aurons

$$B = \frac{BK}{N_0 (e^{KT} - 1)} = \frac{BK}{N_T - N_0} \quad (8)$$

Il faut souligner que des formules analogues étaient déjà développées par RAHN [14] et BUCHANAN [3].

De l'équation (8) nous tirons :

$$N_0 = \frac{BK}{b(e^{KT} - 1)}. \quad (9)$$

Nous obtenons ainsi la relation entre les deux variables : N_0 et T .

L'équation (9) reste en accord avec la théorie primitive de l'enzyme réductase. Cependant des expériences de BARTHEL [1] et de THORNTON et HASTINGS [16] il résulte que le phénomène de la décoloration de BM appartient au procès général d'oxydoréduction, et d'après la théorie de WIELAND la décoloration peut être expliquée de telle manière, que le BM joue le rôle d'un accepteur de l'hydrogène après la disparition de l'oxygène dissous dans le liquide examiné, ainsi qu'il subit une réduction à la leuco-base, grâce à l'abaissement du potentiel « redox » du milieu.

Nous pouvons admettre que les cellules bactériennes activent

l'hydrogène, et c'est pourquoi la valeur B de l'équation (8, 9) doit être changée. La quantité totale des accepteurs de l'hydrogène (exprimée par exemple en miliéquivalents) est donc égale à $B_0 + B_m$, c'est-à-dire à la somme des équivalents de l'oxygène — B_0 et du $BM - B_m$.

Cependant il est clair qu'au commencement de l'épreuve la quantité d'oxygène ne peut pas être égale à celle du lait libre de bactéries, c'est-à-dire du lait stérile. La quantité normale d'oxygène dissous dans le lait stérile sera donc diminuée d'une fraction proportionnelle au nombre des cellules bactériennes au commencement de l'épreuve. La proportionnalité vient du raisonnement suivant : la quantité d'oxygène usée par une cellule — b_0 dans le lait (ainsi qu'éventuellement dans la culture qui servait pour les expérimentations) peut être exprimée comme suit :

$$b_0 = \frac{B'_0 K}{N_{T'} - N_0} \quad (10)$$

où B'_0 désigne la quantité totale d'oxygène consommé. N_0 peut être rejetée comme une valeur négligeable. Nous obtenons alors :

$$b_0 N_{T'} = B'_0 K. \quad (11)$$

Comme $N_{T'}$ est égal à N_0 dans l'épreuve, nous avons une confirmation de la proportionalité entre le nombre initial de cellules et l'épuisement d'oxygène. Désignons par a le coefficient (1), par lequel le nombre initial de bactéries doit être multiplié pour obtenir le manque d'oxygène exprimé en nombres équivalents. Alors toute la quantité des accepteurs d'hydrogène au début de l'épreuve de la réductase, sera égale à $B_0 + B_m - N_0 a$ et puis :

$$b = \frac{K (B_0 + B_m - N_0 a)}{N_0 (e^{KT} - 1)} \quad (12)$$

d'où

$$N_0 = \frac{B_0 + B_m}{a + \frac{1}{K} (e^{KT} - 1)}. \quad (13)$$

La dernière forme de l'équation est celle dont on fera le plus grand usage en comparant graphiquement les nombres initiaux réels des bactéries du lait à ceux trouvés d'après la formule (13). Remarquons ensuite que dans l'équation (13) le terme N_0 sera une variable dépendante, en ce cas-là, de la valeur du terme T, jouant le rôle d'une variable indépendante. Cela va sans dire que les suppo-

(1) On pourrait supposer que $b_0 = b$. Mais il faut souligner que les paramètres b et K sont comptés seulement pour le temps T d'épreuve. On ne peut pas attendre que dans le temps du développement des microorganismes avant l'épreuve ces paramètres soient égaux. C'est pourquoi le coefficient a doit être considéré comme une valeur indépendante du b .

sitions nous permettant de développer ces équations, ont un caractère plus ou moins schématique. On a supposé l'existence des paramètres : K , b et a , qui dans des conditions normales de l'épreuve peuvent être inconstants, vu par exemple la grande complexité de la microflore du lait cru.

Cependant, comme nous nous sommes servis de cultures pures, nous pouvons espérer que la constance de ces paramètres sera suffisante pour que les résultats de nos expériences, à part quelques déviations inévitables dans des recherches biologiques, puissent confirmer ou contredire nos déductions théoriques.

MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

13 souches des bactéries du groupe *Streptococcus lactis* (Lister Löhnis, en cultures pures, isolées du lait et des produits laitiers, ont fait l'objet des expériences ci-dessous. On les employait toujours en état de pleine vigueur reproductive grâce aux passages quotidiens de très petites semences dans le lait stérilisé. L'acidité (titrimétrique) des cultures soumises aux expériences ne dépassait pas 0,45% d'acide lactique. Dans toutes les épreuves on ne se servait que du même lait écrémé et stérilisé pendant 15' à 110° C., puis laissé en repos pendant un mois pour qu'il pût entrer en état d'équilibre avec la pression partielle des gaz de l'atmosphère.

Les nombres des cellules ont été déterminés à l'aide du comptage direct au microscope dans les préparations faites quantitativement. On a fait usage d'une méthode spéciale, rapprochée de celle de BREED [2]. Mais dans la méthode Breed on mesure 0,01 cm³ de lait à l'aide d'une pipette, cependant que nous avons mesuré 0,001 cm³ de culture au moyen d'une ôse de platine d'après BURRI [4], fourni par la firme Haag Streit, de Bern. DORNER et DEMONT [7] ont établi qu'avec l'ôse de platine, on obtient une exactitude suffisante au point de vue pratique. Le lait pour les préparations a été neutralisé et bien mélangé. On a étendu deux préparations parallèles 0,001 cm³ de ce lait sur la surface de 1 cm² de la lame-objet. Elles ont subi une coloration et fixation. En se basant sur les détails du travail de MATUSZEWSKI [12] on a pu atteindre une exactitude d'estimation d'au moins 10%. Le bleu de méthylène pour l'épreuve de la réductase était de MERCK : *Methylenblau medic*. On en a employé une solution aqueuse. La concentration du BM additionné au lait était de 1 : 200.000.

Le mode opératoire de nos expériences a été comme suit. La culture destinée aux expériences ainsi que le lait et les flacons sont demeurés à 28-30° C. pendant 16 heures. Dans les flacons de capacité de 15 cm³ environ, on a versé avec une pipette stérile des volumes variables de la culture bactérienne et de tels volumes de lait stérile

pour que le volume total des deux liquides soit toujours égal à 10 cm³.

Grâce à ce mode opératoire on a obtenu des dilutions connues de la culture streptococcique, ce qui a permis de compter la concentration bactérienne seulement dans la culture initiale. On a versé dans chaque flacon 0,2 cm³ de BM à 0,025% (égal à 0,05 mg. par 10 cm³ de lait). Après avoir mélangé le contenu des flacons et couvert d'un bouchon d'ouate, on les a placés dans l'étuve à 28-30° C. En même temps, on a fait des préparations quantitatives de la culture initiale. Le temps de décoloration a été compté du moment de l'addition de BM jusqu'au moment de la disparition complète de la couleur. Pour estimer le nombre des bactéries au moment de la décoloration, on a fait des préparations quantitatives d'une partie des flacons au moment final de l'épreuve. Le temps T (de la décoloration) n'a pas dépassé 7 heures. Dans les recherches latérales nous avons pu établir qu'une couche isolante d'huile d'olive à la surface du liquide n'exerçait qu'une très faible influence (2 minutes de plus), abaissant le temps de décoloration, et, par conséquent, dans les recherches principales, nous n'avons employé aucune couche isolante. Les expériences avec chacune des couches bactériennes ont été répétées plusieurs fois à des intervalles de quelques jours et même de quelques semaines.

On a toujours attaché une grande importance à l'uniformité de l'état biologique des bactéries étudiées, comme ce n'était qu'à la condition d'une stabilité des souches soumises aux recherches qu'on pouvait en espérer des résultats convenables et assurant de leur côté la constance des paramètres a , b et K variables d'ailleurs ; par exemple on a évité l'influence nuisible de « lag phase » par les passages des cultures en plein état de prolifération dans le même milieu biologique — le lait.

RELATION ENTRE LA DURÉE DE DÉCOLORATION ET LE NOMBRE INITIAL DES GERMES

Le tableau I représente les résultats des expériences avec deux souches bactériennes : n° 1 et n° 2. Dans le tableau II sont comparés les résultats des expériences dans lesquelles furent déterminés les nombres définitifs de microorganismes — N_T . Il y a de plus des valeurs de K , calculées d'après la formule (6), c'est-à-dire des coefficients de la multiplication des cellules par heure, des inverses de K , c'est-à-dire des « temps d'une génération », ainsi que des valeurs b , comptées selon la formule (8) — c'est-à-dire les quantités en milligrammes de matière colorante, correspondantes à une cellule en une heure.

Nous pouvons voir que, indépendamment de certaines erreurs

TABLEAU I.
RÉSULTATS NUMÉRIQUES DES EXPÉRIENCES

<i>Streptococcus cremoris</i> n° 1				<i>Streptococcus lactis</i> n° 2			
	Date	Nombres initiaux des cellules en 10 ⁶ N ₀ . 10 ⁶ / 1 cm ³	Temps de décoloration en heures. T		Date	Nombres initiaux des cellules en 10 ⁶ N ₀ . 10 ⁶ / 1 cm ³	Temps de décoloration en heures. T
1	16.II	2,5	7,00	26.I	0,4	6,83	
2	10.II	5,2	5,58	»	1,2	6,00	
3	16.II	6,3	6,00	»	2,0	5,57	
4	»	7,5	5,50	19.I	2,2	6,00	
5	»	10,1	4,92	»	4,4	4,92	
6	8.II	11,0	5,00	20.I	4,9	4,45	
7	16.II	12,5	4,67	26.I	6,1	4,77	
8	24.III	21,0	4,25	19.I	8,9	4,17	
9	8.II	22,0	4,33	26.I	12,1	3,78	
10	24.II	33,8	3,00	19.I	13,3	3,67	
11	10.II	36,5	3,00	25.I	14,8	3,77	
12	9.II	40,8	2,83	18.I	16,2	3,75	
13	24.III	42,1	2,83	19.I	17,7	3,08	
14	8.II	44,0	2,83	26.I	20,2	3,00	
15	17.II	51,3	2,50	19.I	22,1	2,75	
16	24.III	63,1	2,28	20.I	24,6	3,00	
17	17.II	74,4	1,83	27.I	35,0	3,00	
18	»	77,0	2,08	29.I	42,4	2,75	
19	9.II	81,6	1,67	20.I	49,1	2,45	
20	24.III	84,1	1,67	27.I	69,2	2,10	
21	10.II	109,5	1,33	»	69,9	1,70	
22	8.II	109,9	1,50	25.I	74,1	1,93	
23	24.III	126,2	1,10	18.I	81,2	2,00	
24	17.II	128,3	1,17	29.I	84,9	1,52	
25	8.II	131,9	1,08	27.I	104,9	1,25	
26	24.II	135,0	0,90	29.I	127,3	1,00	
27	17.II	148,8	0,83	27.I	138,4	0,98	
28	9.II	163,3	0,72	»	139,9	1,07	
29	24.III	168,3	0,72	18.I	143,7	0,92	
30	8.II	175,9	0,67	25.I	148,3	1,05	
31	10.II	182,5	0,58	18.I	162,3	0,92	
32	24.III	210,3	0,40	29.I	169,7	0,80	
33	8.II	219,8	0,42	»	212,1	0,58	
34	17.II	223,1	0,25	»	254,6	0,42	
35	9.II	244,9	0,32	27.I	276,7	0,40	
36	17.II	297,6	0,10	29.I	339,4	0,23	
37	9.II	326,5	0,10	»	424,3	0,08	
38	24.II	337,6	0,06	27.I	553,5	env. 0,01	
39	17.II	371,9	0,06	18.I	718,7	< 0,01	
40	9.II	408,1	0,05	27.I	830,2	< 0,01	
41	17.II	446,3	0,03	»	1107,0	< 0,01	
42	9.II	490,0	env. 0,02	»	1383,7	< 0,01	
43	17.II	595,1	» 0,01	18.I	1437,4	< 0,01	
44	9.II	653,0	< 0,01				
45	17.II	743,9	< 0,01				

TABLEAU II.
RÉSULTATS REÇUS A L'AIDE DES FORMULES (6) ET (8)

	N ₀ .10 ⁸	N _T .10 ⁶	D = N _T - N ₀ en 10 ⁶	T heures	K	$\frac{1}{K}$ heures	b. 10-11 mgs.
<i>Streptococcus cremoris</i> n° 1.							
1	5,2	173,5	168,3	5,58	0,6294	1,59	1,87
2	6,3	267,3	261,0	6,00	0,6254	1,60	1,20
3	11,0	225,6	214,6	5,00	0,6044	1,65	1,41
4	22,0	227,8	205,8	4,33	0,5399	1,85	1,32
5	36,5	251,2	214,7	3,00	0,6429	1,56	1,50
6	44,0	231,0	187,1	2,83	0,5864	1,71	1,57
7	74,4	242,7	168,3	1,83	0,6461	1,55	1,92
8	109,5	218,6	109,1	1,33	0,5197	1,92	2,38
9	109,9	260,0	150,1	1,50	0,5741	1,74	1,91
10	131,9	273,6	141,8	1,08	0,6754	1,49	2,38
		moyen	182,1		0,6044	1,67	1,75
<i>Streptococcus lactis</i> n° 2.							
1	0,4	171,1	170,7	6,83	0,8854	1,13	2,59
2	1,2	191,4	190,2	6,00	0,8434	1,19	2,22
3	2,0	209,9	207,9	5,57	0,8335	1,20	2,00
4	4,9	218,4	213,5	4,45	0,8527	1,17	2,00
5	12,1	239,4	227,3	3,78	0,7839	1,28	1,72
6	14,8	247,0	232,2	3,77	0,7461	1,34	1,65
7	16,2	281,2	265,0	3,75	0,7606	1,31	1,44
8	20,2	261,4	241,2	3,00	0,8530	1,17	1,77
9	24,6	205,3	180,7	3,00	0,7077	1,41	1,96
10	35,0	283,6	248,6	3,00	0,6976	1,43	1,40
11	42,4	287,2	244,8	2,75	0,6955	1,44	1,42
12	49,1	291,5	242,4	2,45	0,7266	1,38	1,50
13	69,2	307,8	238,6	2,10	0,7108	1,41	1,49
14	74,1	330,7	256,6	1,93	0,7748	1,29	1,51
15	81,2	289,8	208,6	2,00	0,6361	1,57	1,52
16	143,7	251,7	108,0	0,92	0,6322	1,58	2,93
17	148,3	306,8	158,5	1,05	0,6924	1,44	2,18
18	162,3	295,0	132,7	0,92	0,6557	1,53	2,47
		moyen	209,3		0,7493	1,35	1,88

inévitables dans les expériences biologiques, il y a une assez grande concordance entre les valeurs K, provenant de la même souche. La constance suffisante de K, malgré les variations du temps de la déco-

loration, nous a permis d'adopter la valeur moyenne de K comme un des paramètres de l'équation. Cependant, en ce qui concerne les valeurs b , celles-ci montrent une tendance à l'augmentation quand la durée de la décoloration devient très courte.

Les résultats des expériences ont fourni les valeurs des paramètres de l'équation (9), donnant la relation entre le temps de la décoloration et le nombre initial des cellules. L'équation (9) est basée sur la supposition que les bactéries peuvent réduire directement le bleu de méthylène.

Alors le paramètre B c'est la quantité du bleu additionné à 1 cm³ de lait (= 0,005 mg.), la valeur moyenne de K (tableau II) est égale à 0,6044 pour la souche n° 1 et 0,7493 pour la souche n° 2. L'équation (9) peut s'écrire de façon suivante :

$$\frac{BK}{b} = N_0(e^{Kt} - 1) = N_t - N_0 \quad (14)$$

Les valeurs $N_t - N_0 = D$, c'est-à-dire les accroissements des bactéries dans l'épreuve, se trouvent dans la quatrième colonne du tableau II, dont les valeurs moyennes nous serviront de constantes.

De l'équation (14) nous tirons :

$$N_0 = \frac{N_t - N_0}{e^{Kt} - 1} = \frac{D}{e^{Kt} - 1} \quad (15)$$

Après avoir substitué les valeurs numériques connues aux termes D et K , nous obtenons respectivement :

$$\begin{array}{ll} \text{la souche n° 1} & \text{la souche n° 2} \\ N_0 = \frac{182.100.000}{e^{0,6044t} - 1} & N_0 = \frac{209.300.000}{e^{0,7493t} - 1} \end{array} \quad (16)$$

Quoique pour les temps plus longs de décoloration il y ait une concordance suffisante entre les données expérimentales et celles obtenues à l'aide des formules (16), nous remarquons dans le tableau III que, pour les temps de décoloration plus rapides, les valeurs calculées de N_0 sont beaucoup plus grandes que celles trouvées directement. Ladite relation est illustrée par le graphique I effectué en échelle logarithmique, où les points représentent les résultats empiriques et les courbes pointillées les résultats théoriques d'après les équations (16).

Le manque de concordance nous permet d'accepter l'hypothèse formulée déjà dans le chapitre précédent, que la décoloration du lait a lieu après l'épuisement de l'oxygène jouant un rôle d'accepteur de l'hydrogène. Il est clair que les cultures streptococciques bien développées possèdent moins d'oxygène libre que les cultures moins nombreuses. Comme dans le calcul précédent, ce fait n'a pas été pris

TABEAU III.
COMPARAISON DES VALEURS INITIALES DES CELLULES — No — THÉORIQUES
(ÉQUATION 16) AVEC CERTAINES DONNÉES EMPIRIQUES

<i>Streptococcus cremoris</i> n° 1			<i>Streptococcus lactis</i> n° 2		
Temps de décoloration en heures	Nombres initiaux — No — en 10 ⁶ /1 cm ³		Temps de décoloration en heures	Nombres initiaux — No — en 10 ⁶ /1 cm ³	
	empiriques	théoriques		empiriques	théoriques
7,00	2,5	2,7	6,00	1,2	2,4
6,00	6,3	5,0	4,92	4,4	5,4
5,00	11,0	9,3	3,00	24,6	24,7
3,00	36,5	35,3	2,10	69,2	54,7
2,08	77,0	72,4	1,00	127,3	187,6
1,50	109,9	123,0	0,40	276,7	599,0
1,08	131,9	197,7	0,23	339,4	1112,8
0,40	210,3	713,0	0,08	424,3	3387,0
0,15	337,6	1918,8			
0,06	371,9	4935,0			

en considération, c'est pourquoi il n'y a pas d'accord en cas de cultures fortement développées.

Dans l'équation (13) il y a un coefficient a, qui désigne la quantité d'oxygène qui, multipliée par le nombre initial des bactéries, nous donnera tout le manque d'oxygène au commencement de l'épreuve. La valeur de B₀ désigne la quantité d'oxygène dissous normalement dans un centimètre cube de lait à une température définie. Le terme b y exprime la quantité d'oxygène et de bleu de méthylène par une cellule en une heure.

La teneur en oxygène dissous dans le lait a été déterminée à l'aide de l'appareil van Slyke. Nous avons obtenu 0,07 mg. de O₂ par 10 cm³ de lait à 30° C.

Les valeurs B₀, B_m, a et b ont été exprimées en milliéquivalents. Les valeurs moyennes des a et b ont été obtenues comme suit :

Désignons :

$$c = \frac{b}{K} \quad (17)$$

Il s'agit maintenant de calculer les valeurs approximatives des paramètres a et c.

Vu l'équation (14), la formule (13) peut être écrite :

$$N_0 a + c (N_T - N_0) = B_0 + B_m. \quad (18)$$

Les valeurs de N₀, N_T, B₀ + B_m étant connues par plusieurs expé-

DIAGRAMME I.

Relation entre les temps de décoloration et les nombres initiaux de cellules. Les points empiriques et les courbes théoriques selon les équations (16) et (27).

riences, nous pouvons parvenir aux valeurs approximatives de a et c en minimalisant la somme des carrés

$$\sum (B_0 + B_m - N_0 a - cD)^2 \quad (19)$$

où

$$D = N_T - N_0. \quad (20)$$

Nous obtenons

$$a = (B_0 + B_m) \frac{\bar{\Sigma} N_0 \Sigma D^2 - \Sigma D \bar{\Sigma} D N_0}{\Sigma N_0^2 \Sigma D^2 - (\Sigma D N_0)^2}, \quad (21)$$

$$c = (B_0 + B_m) \frac{\Sigma N_0^2 \Sigma D' - \Sigma D N_0 \Sigma N_0'}{\Sigma N_0^2 \Sigma D^2 - (\Sigma D N_0)^2} = \frac{C}{K}. \quad (22)$$

Pour déterminer K revenons à la formule (5)

$$N_T = N_0 e^{KT} \quad (23)$$

d'où on a

$$\log N_T = \log N_0 + KT \log e. \quad (24)$$

Les valeurs de N_T , N_0 et T étant connues, on obtient K en minimisant la somme des carrés

$$\Sigma (\log N_T - \log N_0 - KT \log e)^2. \quad (25)$$

Ce qui donne

$$K = \frac{\Sigma T (\log N_T - \log N_0)}{\Sigma T^2 \log e}, \quad (26)$$

un résultat qui doit être préféré à la calculation précédente du K moyen ($\bar{K}$).

Après avoir substitué les valeurs ainsi trouvées dans l'équation (13) nous avons obtenu les formules suivantes brutes pour les deux souches streptococciques :

$$N_0 = \frac{\text{Str. cremoris} \quad 9,1 \cdot 10^{-4}}{3,20 \cdot 10^{-12} + \frac{2,42 \cdot 10^{-12}}{0,608} (e^{0,608T} - 1)}; \quad (27)$$

Souche n° 1

$$N_0 = \frac{\text{Str. lactis} \quad 9,1 \cdot 10^{-4}}{2,18 \cdot 10^{-12} + \frac{3,02 \cdot 10^{-12}}{0,810} (e^{0,810T} - 1)}.$$

Souche n° 2

Le tableau IV présente quelques nombres empiriques ainsi que ceux calculés d'après les formules (27). L'accord de ces nombres est stupéfiant. La conformité est encore accentuée par le graphique I, où la ligne en traits pleins caractérise la souche n° 1 et la ligne interrompue la souche n° 2.

On voit que les résultats expérimentaux ne s'opposent pas à l'hypothèse formulée ci-dessus. Il nous semble qu'elle peut être admise au moins pour les souches bactériennes en question.

On a caractérisé de même façon expérimentale et calculatrice, 11 souches de plus du groupe de *Streptococcus lactis*. Pour ne pas alourdir le rapport présenté par trop de tableaux, nous n'en citons que le diagramme II et le tableau V. Le graphique représente, en échelle logarithmique, les courbes calculées pour toutes les souches. Dans le

TABLEAU IV.

COMPARAISON DES VALEURS INITIALES DES CELLULES — No — THÉORIQUES
(ÉQUATION 27) AVEC CERTAINES DONNÉES EMPIRIQUES

<i>Streptococcus cremoris</i> n° 1			<i>Streptococcus lactis</i> n° 2		
Temps de décoloration en heures	Nombres initiaux — No — en 10 ⁶ /l cm ³		Temps de décoloration en heures	Nombres initiaux — No — en 10 ⁶ /l cm ³	
	empiriques	théoriques		empiriques	théoriques
7,00	2,5	3,3	6,83	0,4	1,0
6,00	6,3	6,0	6,00	1,2	1,9
5,00	11,0	11,1	5,57	2,0	2,7
4,25	21,0	17,5	4,92	4,4	4,6
3,00	36,5	38,2	4,17	8,9	8,4
2,28	63,1	60,2	3,00	24,6	22,3
1,83	74,4	80,4	2,00	81,2	52,6
1,08	131,9	132,7	1,70	69,9	68,8
0,90	135,0	149,2	1,00	127,3	130,1
0,72	168,3	169,0	0,80	169,7	163,0
0,40	210,3	211,7	0,42	254,6	246,4
0,25	223,1	236,0	0,23	339,4	309,0
0,15	337,6	254,0	0,08	424,3	374,5

tableau V nous remarquons les nombres initiaux des cellules — et les temps correspondants de décoloration T pour les trois souches les plus différentes. On y voit que les souches particulières, quoique

TABLEAU V.

NOMBRE INITIAUX DE CELLULES No. 10⁶ DANS 1 CM³ ET LES TEMPS RESPECTIFS
DE DÉCOLORATION (VALEURS THÉORIQUES)

Souche n°	Temps de décoloration-heures									
	7	6	5	4	3	2	1	0,75	0,50	0,10
2	0,8	1,9	4,3	9,7	22,3	52,6	130,0	170,6	225,0	364,7
4	5,8	11,3	21,7	41,9	80,9	155,8	299,0	351,7	413,5	535,3
12	30,2	47,3	74,1	118,3	195,6	344,4	693,2	860,3	1099,1	1798,1

appartenant au même groupe streptococcique, ont des temps divers de décoloration. Ces différences seront expliquées plus tard par les diverses rapidités de multiplication et capacités réductrices caractéristiques. Nous voulons souligner que la conformité des données

empiriques avec les données calculées n'était pas, en général, pire que dans le cas des deux premières souches discutées.

DIAGRAMME II.

« Zone » de décoloration pour treize souches de *Streptococcus lactis*.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

L'hypothèse d'après laquelle l'oxygène, seul, est usé, comme accepteur de l'hydrogène, dans l'épreuve de la réductase, exige plus d'attention. Le moment de la décoloration indique pratiquement le moment de son épuisement. BARTHEL [1], THORNTON et HASTINGS [16] ont émis, en outre, l'opinion que la décoloration du bleu est due, au moins en sa partie majeure, non pas à l'action réductrice des bactéries, mais à celle des composants du lait, grâce à l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction après la disparition de l'oxygène. L'accord des données empiriques dans nos recherches avec la thèse que les bactéries font usage, en premier lieu, de l'oxygène dissous dans le lait, semble être surprenant, d'autant plus que le groupe de *Strept. lactis* n'appartient en aucune façon aux bactéries aérobies typiques. Le but des expériences suivantes était de fournir un appui à ces suppositions.

a) En suivant dans tous les détails les modes opératoires identiques avec ceux employés antérieurement, on a effectué plusieurs épreuves avec la souche n° 1, en employant le colorant à doses moitié des doses normales, c'est-à-dire 0,0025 mg. de bleu par 1 cm³ de lait, au lieu de 0,0050 mg. Comme la quantité de bleu additionnée normalement au lait est d'environ 4% de la quantité globale des accepteurs, on pourrait espérer que les temps de la décoloration correspondants aux mêmes valeurs N_o, ne seraient que très peu influencés par le changement de la concentration du colorant.

Or, il résulte du diagramme III que les expériences pratiques ont prouvé nos espérances. La courbe en traits pleins, qui correspond aux doses normales du colorant ainsi que la courbe pointillée correspondant aux moitiés de bleu, ont à peu près le même cours.

Quelques déviations peuvent être expliquées par des erreurs inévitables expérimentales. S'il s'agit de temps très courts, une bifurcation, assez distincte des courbes, se fait remarquer, parce que c'est alors que les doses du colorant, vu le grand épuisement en oxygène, jouent un rôle proportionnellement majeur.

b) On a chassé l'oxygène du lait à l'aide d'un courant d'azote. Le lait ainsi préparé a été inoculé d'un volume connu de culture streptococcique. La surface du lait a été isolée de l'oxygène atmosphérique au moyen d'une couche d'huile d'olive stérile. Les temps de décoloration ont été plus courts de 2 à 3 fois dans le cas d'emploi du courant d'azote (voir la courbe pointillée du diagramme III).

c) Pour les expériences analogues aux précédentes, où la saturation avec un courant d'azote avait eu lieu après l'addition de la culture, le temps de décoloration était moitié de celui sans saturation.

Toutes ces expériences indiquent que le bleu de méthylène joue le rôle d'accepteur de l'hydrogène dans l'épreuve de la réductase

DIAGRAMME III.

L'influence de la dose du colorant sur le processus de décoloration.

après la consommation de l'oxygène par les bactéries. Cependant, nous n'avons pu confirmer l'hypothèse que le colorant est réduit non par les bactéries après l'épuisement d'oxygène, mais par les composants du lait, grâce à l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction.

La supposition mentionnée ci-dessus ne change pas du tout les types des équations développées précédemment. Il suffit seulement que les paramètres a et b soient appelés « les indices de l'hydrogène activé » au lieu de *quantité* et, ceci d'autant plus, qu'il nous semble possible que, en dehors de l'oxygène du lait et du bleu de méthylène, d'autres accepteurs peuvent s'y trouver, influençant les valeurs absolues de a et b .

L'importance de l'oxygène, comme accepteur de l'hydrogène, s'accroît aussi dans les graphiques I et III, où il y a une déviation des points empiriques dans les régions des temps courts de décoloration, de telle façon que les temps indiqués par les courbes sont plus courts que ceux obtenus empiriquement. Cet événement s'explique facilement par le fait que les échantillons de lait plus ou moins exempts d'oxygène, à cause du fort développement des bactéries, étaient exposés à la pénétration de l'oxygène atmosphérique durant les manipulations préliminaires de manière plus accentuée que les échantillons moins dépourvus d'oxygène.

Pendant les longues durées de décoloration (voir le graphique I) une autre déviation, et celle-ci en sens inverse, se fait remarquer en ce que la décoloration a eu lieu plus tôt que les temps prévus par la formule. La même tendance a été montrée par toutes les souches examinées. Des valeurs de K (tabl. II), nous pourrions soupçonner que les rapidités de multiplication se sont abaissées dans cette période de la reproduction, c'est-à-dire que les bactéries se sont trouvées partiellement en dehors de la phase logarithmique de leur multiplication.

C'était l'augmentation de la concentration en ions hydrogène qui pouvait restreindre la multiplication des bactéries. L'acidité potentielle au moment de la décoloration s'était renfermée dans des limites assez restreintes de 0,2 à 0,3% en acide lactique et à peu près constantes chez les souches particulières. Quoique le potentiel d'oxydo-réduction dépende aussi du pH de la solution, cependant, nous ne sommes pas d'avis que ce facteur ait joué un rôle plus important, vu les différences si faibles d'acidité.

D'après les données empiriques, il résulte encore une remarque méthodique : les préparations microscopiques colorées, faites avec de jeunes cultures, fortement proliférantes, peuvent être adaptées avec succès dans le but d'estimation quantitative.

SUR LE RÔLE D'UNE CELLULE DANS LA FLORE BACTÉRIENNE

Le matériel résultant de nos recherches ainsi que les élaborations mathématiques nous ont fourni la possibilité de caractériser le rôle d'une cellule dans la flore bactérienne. Ce rôle est caractérisé par les valeurs K , a et b , reçues indépendamment pour les souches particulières. Comme les valeurs numériques des termes K , a et b résultent de nombreuses expériences, nous pouvons espérer qu'elles sont assez proches de la vérité.

Le tableau VI montre les valeurs numériques des termes mentionnés ci-dessus. Il y a aussi des inverses de K , c'est-à-dire des « temps d'une génération » ainsi que des valeurs de v , c'est-à-dire des volumes moyens d'une cellule comme d'une ellipsoïde sphérique, dont

les deux axes ont été mesurés au microscope dans les cultures vivantes de 16 heures. Nous remarquons dans ce tableau que les fonctions vitales d'une cellule bactérienne sont assez différentes dans les souches particulières. Pour donner une caractéristique plus approfondie, on a calculé les coefficients de corrélation entre b et K , K et v ainsi qu'entre v et b . On a donc obtenu les valeurs des coefficients :

$$r_{bk} = +0,79 ; r_{bv} = +0,63 ; r_{vk} = +0,17$$

D'après FISHER [8] pour 13 observations (11 degrés de liberté)

TABLEAU VI.

TERMES CARACTÉRISANT UNE CELLULE DANS LES SOUCHES EXAMINÉES

Souche n°	K	$\frac{1}{K}$	$b \cdot 10^{-12}$ méq.v.	$a \cdot 10^{-12}$ méq.v.	v en μ^3
1	0,6083	1 h. 38'	2,42	3,20	1,13
2	0,8098	1 h. 14'	3,02	2,18	0,76
3	0,6785	1 h. 28'	1,98	2,53	0,63
4	0,6581	1 h. 31'	1,02	1,60	0,42
5	0,6172	1 h. 37'	2,07	1,89	0,58
6	0,6071	1 h. 39'	1,97	1,91	0,89
7	0,5832	1 h. 43'	1,24	0,98	0,63
8	0,5436	1 h. 50'	0,96	1,44	0,63
9	0,4536	2 h. 12'	1,40	2,37	0,63
10	0,4516	2 h. 13'	1,29	1,20	0,63
11	0,4217	2 h. 22'	0,87	1,22	0,58
12	0,4134	2 h. 25'	0,71	0,44	0,42
13	0,3627	2 h. 46'	1,04	0,58	0,42

les coefficients de corrélation, garantissant une probabilité donnée (coefficient de confiance), sont les suivants :

Coefficient de confiance	0,10	0,05	0,02	0,01
Coefficient de corrélation (r)	0,48	0,55	0,63	0,63

Une corrélation distincte existe donc alors entre la vitesse de reproduction des cellules (K) et l'hydrogène (b) ainsi qu'entre le volume d'une cellule — (v) et l'hydrogène activé. Entre le volume d'une cellule et la vitesse de la reproduction nous ne pouvons pas constater de corrélation, parce que la valeur r n'est pas suffisamment certaine.

La relation entre K et b s'accroît aussi dans le graphique III de telle façon qu'à peu près toutes les courbes ont des cours parallèles, sans sécantes. Cela vient du fait que les deux facteurs mentionnés influent de la même manière sur le temps de la décoloration, parce

que, plus rapide est le développement bactérien, plus fortement l'hydrogène subit une activation, et *vice versa*.

La discussion d'une relation entre les trois variables exige l'emploi de la corrélation dite partielle. Celle-ci consiste à éliminer, par voie de calcul, l'influence d'une des variables sur la relation entre les deux autres variables. Voici les coefficients calculés :

$$r_{vk,b} = -0,69; r_{vb,k} = +0,81; r_{kb,v} = +0,89$$

(le terme troisième après la virgule désigne une variable éliminée).

Dans le cas des 13 observations (10 degrés de liberté) les moindres valeurs de coefficient r pour les divers coefficients dits de confiance sont les suivantes :

Coefficient de confiance	0,10	0,05	0,02	0,01
Coefficient de corrélation (r)	0,50	0,58	0,66	0,71

C'est donc entre le volume de la cellule et la vitesse de la multiplication qu'une corrélation distincte négative existe après l'élimination de l'influence du facteur b .

Alors, *caeteris paribus*, plus grande était une cellule, plus intensivement était-elle capable d'activer l'hydrogène et pouvait-elle se reproduire avec moins de vigueur. Entre la vitesse de la reproduction et la quantité d'hydrogène activé, on constate une corrélation très nette, dont le coefficient, égal à $+0,89$, surpasse énormément, même la probabilité de 1% (d'après le coefficient de confiance).

L'existence des corrélations si nettes entre les trois variables en question ne nous autorise pas à supposer qu'il s'agit ici d'une dépendance causale.

Bien que l'existence de telles relations soit tout à fait compréhensible au point de vue biologique, nous n'en tirerons plus de conclusions et nous nous bornons à constater les faits comme quelques contributions expérimentales aux problèmes théoriques, entrepris déjà par RAHN [4] et SKAR [15] en ce qui concerne les relations entre les fonctions vitales d'une cellule bactérienne.

Il faut encore discuter la relation entre les paramètres a et b . En cas idéal, ces deux valeurs devraient être complètement parallèles. Les termes a caractérisent l'intensité d'activation de l'hydrogène dans la période précédant l'induction des bactéries aux épreuves, cependant que b caractérise la même intensité mais dans la durée des épreuves. Quoique le coefficient compté de corrélation soit de $+0,63$, il n'y a pas d'accord complet entre ces deux valeurs. L'explication d'une telle relation n'est pas difficile, parce que, dans la période de 16 heures environ, à laquelle les bactéries ont été soumises avant leur addition au lait, au début de l'épreuve, quelques facteurs, intervenant plus ou moins, ont pu changer l'état biologique des cultures. HIRSCH [9], par exemple, a constaté l'existence des phases se

succédant alternativement d'une reproduction intense, suivie d'une phase d'assimilation intense. WALKER, WINSLOW, HUNTINGTON et MOONEY [18] distinguent même une phase de « jeunesse physiologique » durant laquelle la fermentation est plus intense. On ne peut pas non plus préjuger de la variabilité de la vitesse de reproduction des cellules chez les souches particulières dans les périodes précédant celles des épreuves de la réductase. Il résulte, des données de MASON [11], que cette variabilité peut être de quelque importance. Celui-ci rapporte que le temps le plus court de division d'une cellule en deux autres, pour *Str. lactis*, est de 23,5 à 37 minutes, cependant que, dans nos expériences, cette période, dite « generation times », a dépassé une heure dans tous les cas.

RÉSUMÉ

Le travail présenté avait pour but une interprétation mathématique de l'épreuve de la réductase, effectuée avec les cultures pures de *Streptococcus lactis*. Les déductions théoriques ont été confrontées avec un matériel empirique. On a élaboré une formule donnant la relation mathématique entre le nombre initial de cellules bactériennes et le temps de décoloration du bleu de méthylène dans le lait. On s'est appuyé sur les trois hypothèses : 1^o que les bactéries ont été en phase logarithmique de reproduction, 2^o que chaque cellule a été capable d'activer une même quantité d'hydrogène dans l'unité de temps, et, 3^o que le bleu de méthylène, additionné au lait, a joué le même rôle que l'oxygène y dissous, c'est-à-dire le rôle d'un accepteur d'hydrogène. Le moment de la disparition de la teinte du lait examiné, indiquait donc le moment de l'épuisement de ces deux accepteurs ; 13 souches bactériennes du groupe de *Streptococcus lactis* ont été soumises aux expériences dans le lait écrémé et stérilisé. Les résultats des expériences ont prouvé de façon satisfaisante nos déductions théoriques. On a pu établir en outre que :

1^o La préparation colorée microscopique faite quantitativement peut être employée avec succès dans le but d'estimer des cellules vivantes dans les jeunes cultures.

2^o Les souches particulières ont démontré des variabilités individuelles en ce qui concerne : le temps de reproduction (de 1 h. 14' jusqu'au 2 h. 46') et l'intensité d'activer l'hydrogène (de $0,71 \cdot 10^{-12}$ jusqu'au $3,02 \cdot 10^{-12}$ milliéquivalents par heure).

3^o Entre le volume des cellules et la vitesse de la reproduction on a constaté une corrélation nettement négative, pendant qu'entre l'intensité de l'hydrogène activé et la vitesse de la reproduction ainsi qu'entre l'hydrogène activé et le volume d'une cellule, la corrélation a été distinctement positive.

BIBLIOGRAPHIE.

- [1] Chr. BARTHEL, *Zeitschr. f. Unters. Nahrungs und Genussmittel*, 34, 137, 1917.
- [2] R. S. BREED, *Zentr. f. Bakt. A.*, II, 30, 337, 1911.
- [3] R. E., BUCHANAN, *Abstr. Bact.*, 2, 11, 1918.
- [4] R. BURRI, *Le Lait*, 9, 1028, 1929.
- [5] S. DLUZIEWSKI, *Polska Gazeta Lekarska*, 8, n° 32, 1929.
- [6] W. DORNER, *Le Lait*, 13, 595, 1933.
- [7] W. DORNER et P. DEMONT, *Le Lait*, 9, 909, 1931.
- [8] R. A. FISHER, *Statistical Methods for Research Workers*, table V A., 1930.
- [9] J. HIRSCH, *Klin. Wochenschr.*, 12, 191, 1933.
- [10] E. LÖFFLER et R. RIGLER, *Zentr. f. Bakt.*, A. I, 99, 1, 1926.
- [11] M. M. MASON, *Journ. of Bact.*, 29, 103, 1935.
- [12] T. MATUSZEWSKI, *Medycyna Doswiadcz. i Spoleczna*, 18, z. 5-6, 1934.
- [13] K. L. PESCH et U. SIMMERT, *Milchwirtsch. Forschungen.*, 8, 551, 1929.
- [14] O. RAHN, *Zentr. f. Bakt.*, A. II, 32, 375, 1912.
- [15] O. SKAR, *Intern. Milchw. Kongr. Vorträge 2 Sektion, Deutsche Ausg.*, 58, 1931.
- [16] R. H. THORNTON et E. G. HASTINGS, *Journ. of Dairy Science*, 13, 221, 1930.
- [17] T. THUNBERG, C. OPPENHEIMER et L. PINCUSSEN, *Die Methodik der Fermente*, 1118, 1929.
- [18] H. H. WALKER, C. E. A. WINSLOW, E. HUNTINGTON et M. G. MOONEY, *Journal of Bact.*, 27, 303, 1934.

UN COEFFICIENT DE PROPRETÉ DU LAIT

par le Dr ALBERT FOURNIER

membre de la Ligue du Lait.

Dans la séance du Conseil d'administration de la « Ligue du Lait » réuni chez son secrétaire général, M. Ch. GROLLET, le 28 mars 1935, j'ai proposé la détermination d'un coefficient d'un indice de propreté du lait, basé sur la détermination quantitative et qualitative de ses impuretés solides (1).

La propreté du lait est en effet une des qualités particulièrement souhaitée par la « Ligue du Lait ». Les souillures n'apparaissant pas sont méconnues par le consommateur et le plus souvent sans importance pour le producteur vis-à-vis duquel, en général, la propreté est une notion peu familière. Seul l'industriel la connaît, mais reste impuissant en raison de l'indifférence générale. La « Ligue du Lait » n'ignore pas le beau rôle qu'elle peut jouer auprès du public en lui faisant connaître que le lait n'étant pas propre, elle s'est donné pour tâche d'encourager sa propreté. Une opinion publique pourrait être facilement créée dans ce sens, surtout par la voie de la Presse qui touche aujourd'hui à peu près toute la collectivité.

(1) Revue de Pathologie comparée. N° 465, juin 1935, p. 723.