lactique et de déchets de galalith, le tout en poudre additionnée d'un poids égal d'eau, a donné, à 20 centimètres de lampes à 20 centimètres (étuve aérée), soit pour une dépense de 0,62 W./cm² (figure 5), les résultats indiqués au tableau ci-dessous.

Le pouvoir réflecteur de ces poudres à l'état sec était respectivement de 32, 36 et 24% pour le flux total des lampes de séchage, et de 25, 26 et 20% à l'état mouillé.

Fig. 5. — Séchage de poudres mouillées de 50 % d'eau sous 1 cm. d'épaisseur et pour une dépense de 0,62 w/cm².

Temps	Perte % sous 1 cm. d'épaisseur		
	C. Présure	C. Lactique	Galalith
0	0	0	0
15 min.	10	15	25
30 min.	25	30	45
45 min.	35	42	50
1 h.	40	50	—
1 h. 15	45		
1 h. 30	50		

On voit que l'industrie de la caséine, tant au stade de la fabrication qu'à celui de l'utilisation, doit s'intéresser aux nouveaux procédés de séchage par rayonnement infrarouge dont l'utilisation apporte aux techniciens de cette industrie un auxiliaire de qualité.

L'ÉPREUVE DE LA RÉDUCTASE DANS LE CONTRÔLE DE LA QUALITÉ DES LAITS PASTEURISÉS

par

A. EYRARD

Directeur

Laboratoire des Groupements interprofessionnels laitiers.

Mlle S. REY

Préparatrice

I. Objet

Le contrôle de la qualité des laits pasteurisés se révèle nécessaire, la pasteurisation ne présentant de garanties qu'en étant étroitement contrôlée. Ce contrôle doit s'assurer qu'un traitement

thermique suffisant pour assurer la destruction des germes pathogènes a été réalisé, d'une part, et que le bénéfice de l'action bactéricide obtenue n'a pas été compromis par des recontaminations ultérieures, d'autre part.

Sur le plan bactériologique, ce contrôle suppose des vérifications nombreuses, délicates et onéreuses. Par ailleurs, quand un lait a été abondamment recontaminé, l'analyse bactériologique très sensible n'offre qu'un intérêt relatif. Il importe peu, en effet, de savoir si un lait pasteurisé contient 3, 5, ou 10 millions de germes par centimètre cube, une population microbienne aussi exagérée indiquant une recontamination qui remet en question toute l'efficacité de la pasteurisation. De même, dans ces conditions la détection des bactéries coliformes ne donne aucune précision complémentaire, toute contamination après pasteurisation apportant automatiquement dans le milieu, des germes du groupe des bactéries coliformes.

Dans l'espoir de simplifier la technique du contrôle, nous avons cherché à nous rendre compte dans quelle mesure une épreuve indirecte comme l'épreuve de la réductase pourrait permettre une simplification et, par suite, une rationalisation des épreuves de laboratoire.

II. Généralités

L'épreuve de la réductase microbienne, utilisée pour apprécier notamment la qualité des laits crus a fait l'objet d'innombrables études, toutefois l'analyse bibliographique de ces recherches est assez décevante, car il est difficile d'en dégager quelques notions précises bien établies.

Pour certains auteurs, il existe une relation plus ou moins étroite entre la charge microbienne des laits crus et leur aptitude à réduire le bleu de méthylène, la spécificité des germes étant beaucoup moins importante que leur nombre total. On a proposé à cet égard des tables de correspondance dont les plus raisonnables sont celles réunies dans le tableau I.

La relation est donc très lâche et il est difficile d'évaluer la population microbienne d'un lait en fonction du temps de réduction correspondant.

Pour d'autres auteurs au contraire, le temps de réduction dépend surtout de la nature des germes et notamment de leur action sur le potentiel d'oxydo-réduction du milieu. Il est raisonnable de penser, après les travaux de BURRI et KURSTEINER [1], puis de Ch. BARTHEL [2], que le phénomène de la réduction du bleu de méthylène dans le lait est conditionné principalement par l'absence d'oxygène, absence due à la vie microbienne dans le milieu. Les germes aérobies mal adaptés au lait et les germes anaérobies stricts peu avides d'oxygène seront donc de faibles réducteurs ;

TABLEAU I
ECHELLE DE CORRESPONDANCE ENTRE LE TEMPS DE RÉDUCTION
ET LA NUMÉRATION MICROBIENNE

Temps de décoloration du bleu de méthylène	Nombre de germes microbiens par centimètre cube de lait correspondant d'après :		
	Ch. BARTHEL et ORLA-JENSEN	H. C. TROY	ROCHAIX et TAPERNOUX
t. < 15 m.			> 20.000.000
t. < 20 m.	> 20.000.000		3 à 20.000.000
15 m. < t. < 2 h.			
20 m. < t. < 2 h.	4 à 20.000.000		
t. < 2 h.		> 1.500.000	
2 < h. t. < 3 h.		300.000 à 1.500.000	
2 < h. t. < 5 h. 30	500.000 à 4.000.000		
2 < h. t. < 7 h.			100.000 à 3.000.000
t. > 3 h.		< 300.000	
t. > 5 h. 30	< 500.000		
t. > 7 h.			< 100.000

au contraire, les anaérobies facultatifs seront des réducteurs énergiques. C'est dire que les germes du groupe des entérobactériacées sont beaucoup plus réducteurs que les ferments lactiques vrais.

Quand on a affaire à un lait ensemencé spontanément, l'épreuve de la réductase permet donc de juger de la nature des contaminations subies (bactéries coliformes en particulier) et de la pullulation de ces contaminations. D'où l'intérêt de cette épreuve dans le contrôle des laits crus.

L'épreuve de la réductase a été ainsi utilisée dans plusieurs pays, pour effectuer une véritable catégorisation des laits de consommation vendus à l'état cru. Les échelles des temps de décoloration retenus sont sensiblement correspondantes ainsi qu'on peut en juger dans le tableau II ci-après :

TABLEAU II

Qualité	Suède Danemark	Etats-Unis	Angleterre pour les laits accrédités	
			Hiver	Été
Bon	t. > 6 h.	t. > 5 h. 30	t. > 5 h. 30	t. > 4 h. 30
Moyen	2 h. < t. < 6 h.	2 h. < t. < 5 h. 30		
Mauvais	15 m. < t. < 2 h.	20 m. < t. < 2 h.		
Très mauvais	t. < 15 m.	t. < 20 m.		

III. Technique expérimentale

Nous entendons par épreuve de la réductase la recherche de la réductase microbienne telle qu'elle a été définie par Ch. BARTHEL et ORLA-JENSEN.

Nous utilisons la méthode préconisée par ces deux auteurs, modifiée suivant la méthode standard américaine. La recherche est effectuée sur 10 cm³ de lait auxquels on ajoute 1 cm³ d'une solution standard de bleu de méthylène obtenue en dissolvant 1 tablette de *Orla-Jensen* (Blauenfeldt und Tvede) dans 800 cm³ d'eau distillée stérile. Cette solution de bleu de méthylène a une concentration de 0,005 % et l'essai ainsi réalisé comporte une addition de 0 mgr. 05 de B. M. pour 10 cm³ de lait.

Afin d'éviter l'apparition de résultats aberrants dus à des contaminations en cours d'expérience, tous les essais furent effectués dans du matériel stérile. L'incubation fut réalisée à l'étuve à 37° C. dans des tubes obturés par bouchons catoutchouc, non agités et à l'abri de la lumière.

En se basant sur les expériences de BURRI et KURSTEINER [1] corroborées par Ch. BARTHEL [3], il semble que le lait soit l'agent réducteur principal, ce pouvoir réducteur n'apparaissant qu'au moment où le lait a été débarrassé totalement de l'oxygène qu'il contenait. C'est ce qui explique le retard de la décoloration quand on agite le lait avant l'addition du colorant.

BARTHEL, THORNTON et HASTINGS [4] ont montré que le lait frais était habituellement saturé d'oxygène et intervenait d'une manière comparable dans la réaction. Mais le lait pasteurisé interviendra différemment suivant le mode de pasteurisation et de réfrigération employé (à l'air libre ou à l'abri de l'air) et surtout suivant le temps écoulé entre le moment de la réaction et celui de la pasteurisation, temps qui aura permis ou non à l'équilibre oxydo-réducteur de se rétablir.

La pasteurisation n'aura d'ailleurs pas pour seul résultat de modifier le comportement immédiat du lait par rapport au bleu de méthylène. Elle modifiera également son comportement futur en agissant, d'une manière quantitative et qualitative, sur la flore microbienne en suspension. La décoloration du bleu de méthylène par le lait pasteurisé est donc une fonction complètement différente de celle réalisée par le lait cru. Un seul facteur commun, la réduction imputable aux germes recontaminant les laits pasteurisés, qui sont pour la majeure partie, des germes contaminant les laits crus et notamment les espèces du groupe des pseudoferments lactiques, réducteurs puissants.

L'épreuve de la réductase appliquée au contrôle des laits pas-

teurisés peut donc nous donner une idée des recontaminations subies par le lait après pasteurisation. A ce titre, l'épreuve est intéressante, mais il était nécessaire d'avoir une idée plus précise quant à la sensibilité et à la fidélité des indications fournies par la méthode.

C'est le but des essais entrepris au Laboratoire dans les conditions suivantes :

Dans le courant des mois d'avril, mai, juin 1942, les laits provenant de 116 ateliers de pasteurisation ont été analysés en moyenne deux fois par semaine. Chaque fois, on effectuait entre autres épreuves la numération bactérienne et l'épreuve de la réductase.

L'épreuve de la réductase était exécutée suivant la technique ci-dessus indiquée. La numération microbienne était effectuée par la méthode des plaques gélosées, en utilisant comme milieu de culture un milieu à base de lait écrémé dilué, préalablement digéré par la papaïne et gélosé, suivant la technique proposée par GUITONNEAU et CHEVALIER [5].

Chaque échantillon était soumis à l'analyse en moyenne 18 à 24 heures après la pasteurisation.

Ces conditions furent strictement observées au cours de la totalité de cette expérience qui a porté sur 2.403 essais. Les résultats comparés de la réductase et de la numération microbienne sont rassemblés dans le tableau III. Les temps de réduction sont comptés en heures, les dénombrements microbiens en germes par centimètre cube de lait. Nous avons exprimé les résultats obtenus, pour 100 essais positifs enregistrés à un temps de décoloration déterminé, de manière à rendre les résultats comparables entre les différents temps de décoloration retenus.

L'examen du tableau III montre que le temps de décoloration de 4 heures correspond à une dissémination également répartie par rapport aux numérations microbiennes. De part et d'autre de ce temps les résultats tendent à se rassembler sur les numérations faibles (temps de 5, 6 et plus de 6 heures) et sur les numérations élevées (temps de 1, 2 et 3 heures). Remarquons notamment la grande fidélité des résultats obtenus pour un temps de réduction inférieur à 1 heure où les aberrances sont extrêmement faibles et de l'ordre des erreurs d'expérience. Il en est de même pour le temps de réduction supérieur à 6 heures ; 100.000 germes au centimètre cube semble être un seuil au-dessus duquel on a peu de chances d'observer un temps de réduction supérieur à 6 heures. Là encore les aberrances sont de l'ordre des erreurs d'expériences.

TABLEAU III

Temps de réduction en heures	3.000.000	2.000.000	1.000.000	900.000	800.000	700.000	600.000	500.000	400.000	300.000	200.000	100.000	moins de 100.000
≤ 1	92,5	0,8	2 75	1,6	0,4	0	0	0	0	0,8	0,4	0,8	0
< 2	52,1	6,9	14,9	4,25	4,25	1,05	2,65	3,2	3,7	4,25	2,1	0,5	0
< 3	20,4	2,15	10	7,5	4,65	5,7	6,1	9,7	8,25	8,6	8,25	6,45	2,15
< 4	7,4	0	3,9	1,7	1,3	4,3	4,75	7,35	9,95	10,8	19,5	23,8	5,2
< 5	0,3	0,3	0,9	0,3	1,8	0,9	1,5	3,0	3,9	5,4	18,4	29,8	33,4
< 6	1,1	0	0,55	0	0,3	0,3	0,5	2,45	3,8	4,9	7,95	27,1	50,95
> 6	0,8	0	0,65	0,25	0,15	0	0,15	0,65	0,8	1,3	3,45	14,	77,7

IV. Etude de la sensibilité de l'épreuve de réduction

Etant donné l'ensemble des résultats obtenus, voyons s'il existe une relation entre les différents temps de réduction et les dénombrements microbiens correspondants. Calculons pour chaque temps de décoloration étudié le dénombrement microbien moyen correspondant. Ces chiffres sont rassemblés dans le tableau IV :

TABLEAU IV

Temps de décoloration	Nombre de germes au centimètre cube (Moyenne)
t. < 1 h.	2.967.000
t. < 2 h.	1.995.000
t. < 3 h.	1.066.000
t. < 4 h.	526.000
t. < 5 h.	234.000
t. < 6 h.	182.000
t. > 6 h.	160.000

Ces chiffres nous permettent de construire la courbe (graphique I) représentant la variation des charges microbiennes moyennes

correspondant à des temps de réduction croissants. Pour avoir une commune unité de représentation, les charges microbiennes sont exprimées par le logarithme des nombres de germes correspondants.

L'examen de la courbe montre qu'il semble exister une relation simple entre les logarithmes des nombres de germes et les temps de réduction correspondants. Cette relation a été également signalée par FRANK [6], THORNSTON et HASTINGS [4] et ROBERTSTON et FRAYER [7] étudiant l'épreuve de la réductase microbienne des laits crus.

Mais dès maintenant, une remarque s'impose. Alors que ces auteurs signalent cette relation comme relativement continue, l'étude des laits pasteurisés rapportée ici montre, au contraire une discontinuité extrêmement nette dans cette relation.

Les points A, B, C se trouvent en effet sur une même droite D1 alors que les points E, F et G se trouvent alignés sur une droite D2 d'inclinaison très différente. La relation étudiée est donc représentée par deux progressions géométriques de raison différente.

Les coefficients angulaires D1 et D2 montrent que la mesure du temps de décoloration est une épreuve plus sensible pour des laits très chargés en germes que pour des laits relativement pauvres.

La relation existant entre les logarithmes des nombres de germes et les temps de décoloration correspondants montre que si le dénombrement microbien permet d'apprécier quantitativement la flore microbienne existant à un moment donné dans le milieu, la mesure du temps de réduction nous donne une idée de l'activité de ces mêmes germes dans le temps. Or, cette activité est surtout représentée par le développement de l'espèce la plus favorisée qui se trouve en période logarithmique de multiplication. Autrement dit, l'épreuve de la réductase paraît être la mesure indirecte de la phase logarithmique du développement de l'espèce microbienne prédominante.

Si l'on étudie le lait pasteurisé, on voit, comme cela a déjà été démontré [8] que la flore microbienne ayant résisté à la pasteurisation ne se développe que très lentement dans le lait et ne peut donc fournir dans des conditions de conservation normale une flore pré-

dominante capable d'atteindre la phase logarithmique de son développement.

Dans le cas d'un lait pasteurisé non recontaminé, on n'atteindra donc jamais la zone de sensibilité de l'épreuve de réduction. Ce manque total de sensibilité explique la fidélité d'expression de la méthode pour des laits pasteurisés à faible charge microbienne.

Il en va tout autrement pour les laits recontaminés. Les germes apportés, non affaiblis, sont en général bien adaptés au lait puisqu'ils proviennent communément de cultures entretenues fortuitement dans l'appareillage ou la vaisselle laitière. Notons que parmi ces germes, les pseudoferments lactiques du groupe des entérobactériacées sont toujours abondamment représentés. Dès que les conditions de température deviennent favorables, ces germes envahissent le milieu, en atteignant très rapidement la phase logarithmique de leur développement.

Dès ce moment, nous nous trouverons dans la zone de sensibilité maxima de l'épreuve de réduction, d'où fidélité des indications ainsi fournies.

L'épreuve de la réductase microbienne nous permettra donc de déceler les laits pasteurisés fortement recontaminés et conservés à des températures permettant la prolifération rapide des germes recontaminants.

V. Conclusions

La fidélité de la méthode n'est satisfaisante que dans les zones de sensibilité maxima et minima. Autrement dit, seuls les temps de réduction inférieurs à une heure ou supérieurs à six heures peuvent être considérés comme des indications valables de la qualité bactériologique des laits pasteurisés.

Il est donc impossible de substituer purement et simplement l'épreuve de la réductase microbienne au dénombrement microbien dans le contrôle de la qualité d'un lait pasteurisé.

Mais il faut remarquer cependant que la réductase microbienne nous permet d'apprécier, une heure après leur réception au laboratoire les laits pasteurisés très fortement pollués, rendant inutile le dénombrement microbien qui dans ce cas n'apporterait aucune précision complémentaire.

Une rationalisation du contrôle est donc obtenue en effectuant systématiquement l'épreuve de la réductase sur les échantillons de lait soumis à l'analyse ; ce qui permet de classer les échantillons en trois lots :

1° Les échantillons réduisant le bleu de méthylène en moins d'une heure et pour lesquels il est inutile de pousser plus loin l'analyse, leur qualité étant par trop insuffisante pour qu'ils puissent

être considérés comme pasteurisés. La rapidité des résultats peut d'ailleurs permettre, le cas échéant, d'interdire leur mise en vente ;

2° Les échantillons dont le temps de réduction est compris entre 1 et 6 heures. On sait qu'ils ont été recontaminés plus ou moins fortement et conservés dans des conditions telles que ces contaminations ont pu se développer plus ou moins abondamment. Pour eux le dénombrement microbien s'impose afin de déterminer exactement l'ampleur de la pullulation microbienne dont ils sont le siège ;

3° Les échantillons décolorant le bleu de méthylène en plus de six heures : laits non recontaminés, ou n'ayant subi que de très faibles recontaminations qui n'ont trouvé aucune des conditions nécessaires à leur multiplication. Pour pouvoir juger de la qualité hygiénique de ces laits, le dénombrement microbien est nécessaire et a intérêt à être complété par la recherche des bactéries coliformes [9] qui permettront la détection de très faibles recontaminations.

Bien entendu, il est nécessaire d'effectuer préalablement à l'épreuve de la réductase, la vérification du chauffage indispensable pour détruire les bactéries pathogènes préexistantes. Enfin, la recherche préalable de l'eau oxygénée s'impose, sa présence faussant au premier chef les indications de l'épreuve de la réductase microbienne.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BURRI et KURSTEINER. *Milchw Zentralbl.*, 1912, 41, 40.
- [2] Ch. BARTHEL. *Zeitschrift für Untersuchung der Nahrungs und Genußmittel*, 1917, 34, 137.
- [3] Ch. BARTHEL. *Arkivf. Reini, Mineralogi et Geologi*, 1925, IX.
- [4] H. R. THORNTON et E. G. HASTINGS. *Journal of Dairy Sciences*, 1930, 13, 221.
- [5] GUITTONNEAU et CHEVALIER. *Le Lait*, janvier 1941, p. 1.
- [6] L. C. FRANK. *Standard Milk Control Code, Tentative Draft of the U. S. Public Health Service*, 1927.
- [7] A. H. ROBERTSON et J. M. FRAYER. *Vermont Agr. Exp. Station Bull.*, nos 314, 15, 16, 17 et 318, juin 1930, Burlington Vt.
- [8] G. GUITTONNEAU, G. MOCQUOT et A. EYRARD. *Bulletin de l'Académie de Médecine*, 21-12, 37, t. CXVIII, n° 39, p. 754.
- [9] G. GUITTONNEAU, G. MOCQUOT et A. EYRARD. Sur la Colimétrie appliquée au contrôle de la pasteurisation des laits et des laits pasteurisés. *Le Lait*, février 1939, t. XIX, pp. 113 à 139.