Conclusions

Une technique simple et exacte pour le dosage des chlorures dans les produits laitiers est représentée par la méthode mercurimétrique de E. VOTOCEK.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] E. VOTOCEK. *Chem. Ztg.*, 1918, 42, 257-270.
[2] I. M. KOLTHOFF et A. BAK. *Chem. Weekbl.*, 1922, 19, 14.

CONTRIBUTION AU CONTROLE BACTÉRIOLOGIQUE DU LAIT

par

Dr COSTAS G. MACRIS et COSTAS G. TZIVANOPOULOS

(Institut Chimique et Bactériologique d'Athènes)

DEUXIÈME PARTIE (*)

I. INTRODUCTION

Dans une note préliminaire [1] nous avons proposé l'utilisation de l'action réductrice provoquée par quelques bactéries, et spécialement par les colibacilles, qui réduisent les nitrates en nitrites, lorsqu'on veut évaluer la valeur hygiénique d'un lait cru ou pasteurisé.

L'épreuve de la nitroréductase, comme nous avons appelé la méthode préconisée, peut donner par une manière simple, avec peu d'instruments, et surtout dans un laps de temps pas trop long, des indications précieuses et des renseignements assez satisfaisants pour qu'on puisse préjuger de la qualité hygiénique d'un lait.

Dans cette partie de notre étude nous avons pris à tâche :

1. De faire une détermination quantitative de la réaction de la nitroréductase par le dosage des quantités des nitrites qui peuvent apparaître suivant le temps de l'action réductrice et le nombre initial des microbes d'un lait, afin de chercher leur corrélation.

2. De faire parallèlement un contrôle de la réaction de la nitroréductase avec la réaction de la réductase (décoloration du bleu de méthylène) et le nombre total des microbes, ainsi que celui des coliformes.

3. De fixer une technique standard et plus commode pour l'emploi de la réaction de la nitroréductase à l'évaluation du degré de propreté d'un lait.

(*) Première partie. *Le Lait*, 1951, 31, 7.

4. De prouver l'action dénitrifiante des différentes espèces de germes qui se développent pendant l'incubation à 37° de plusieurs échantillons de lait.

5. De chercher si l'on peut substituer le « colititre » par la méthode de la nitroréductase.

II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

A. L'évaluation de la valeur hygiénique des échantillons du lait par les méthodes usuelles

Dans l'étude que nous avons entreprise pour répondre aux questions précédentes, nos recherches se sont étendues sur plusieurs échantillons de lait, qu'on peut, selon leur provenance, diviser en trois groupes :

1. Lait provenant de petits fermiers, qui se vendent aux laiteries de la ville d'Athènes.

2. Lait transportés par les fermiers à une usine de pasteurisation.

3. Lait pasteurisés.

Comme nous l'avons déjà vérifié, l'action des microbes d'un lait est proportionnelle à leur nombre. Dès lors il est évident qu'il faudrait connaître tout d'abord la teneur en germes des échantillons de lait à examiner pour pouvoir faire la comparaison avec les résultats donnés par l'épreuve de la nitroréductase.

Pour ce but, nous avons effectué, pour les différents échantillons de lait, deux numérations :

1. **Du nombre total des microbes.** — Nous avons opéré suivant la méthode de la culture sur gélose en boîtes de Petri, en utilisant des dilutions de lait en rapport :

1/10^e, 1/100^e, 1/1.000^e, 1/10.000^e, 1/100.000^e.

Dans chaque boîte de Pétri nous mettions 10 à 12 cm³ du milieu nutritif, préalablement fondu et refroidi à 43° C., et qui avait été ajusté à un pH 6,6 à 7, puis nous mélangions soigneusement 1 cm³ d'une des dilutions du lait.

Après solidification de la gélose, l'incubation à l'étuve à 37° C. durait quarante-huit heures.

2. **Du nombre des coliformes.** — Pour la numération des colibacilles nous avons fait une deuxième culture en boîtes de Petri dans un milieu spécial, contenant du bleu de bromothymol et de la tryptaflavine, et qui se prépare comme suit :

Bouillon, 1.000 cm³ ; peptone liquide, 10 cm³ ; chlorure de sodium, 5 grammes.

Après avoir ajusté le pH à 7,8 on ajoute 25 grammes de gélose et on filtre. Au liquide filtré on ajoute 10 grammes de lactose et 10 cm³ d'une solution alcoolique à 1,5% de bromothymol, lorsque le milieu devient verdâtre et montre un pH 6,8. Après une répartition du milieu en portions de 100 cm³ on stérilise à l'autoclave, et, avant l'usage on ajoute, à chaque portion de 100 cm³, 0 cm³ 5 d'une solution aqueuse de tryptaflavine à 1%.

La numération des colonies de coliformes s'effectue après une incubation de dix-huit heures à 37° C. *Les colibacilles donnent des colonies jaunes.*

Par cette opération nous avons compté que 30 à 80% du nombre total des microbes dépistés par la culture des différents échantillons du lait consistent en coliformes.

3. Epreuve de la réductase. — Parallèlement à la numération du nombre total des microbes et du nombre des colibacilles existant dans les échantillons du lait, nous avons déterminé l'acidité et le temps de décoloration du bleu de méthylène par la réductase microbienne, c'est-à-dire par l'activité des bactéries.

TABLEAU I

RÉSULTATS DE L'EXAMEN DES ÉCHANTILLONS PAR LES MÉTHODES USUELLES

Expériences	Laits	Nombre de microbes	Réductase (temps de décoloration)	Acidité (en centimètres cubes de N/1 NaOH)
1.....	Pasteurisé	$3,4 \times 10^3$	Au-dessus de 8 h.	1,6
2.....	Pasteurisé	$0,55 \times 10^3$	Au-dessus de 8 h.	1,8
3.....	Pasteurisé	$3,8 \times 10^3$	Au-dessus de 8 h.	1,9
4.....	Cru	$12,8 \times 10^6$	Dans 1 h. et 10'	1,9
5.....	Cru	$4,0 \times 10^6$	Dans 2 h. et 30'	1,8
6.....	Cru	$2,76 \times 10^6$	Dans 4 h. et 30'	1,8
7.....	Cru	35×10^6	Dans 10'	4,4
8.....	Cru	28×10^6	Dans 20'	3,7
9.....	Cru	$2,8 \times 10^6$	Dans 1 h. et 30'	1,8
10.....	Pasteurisé	$4,5 \times 10^3$	Dans 7 h. et 30'	1,9
11.....	Aseptiquement récolté	$0,3 \times 10^3$	Au-dessus de 8 h.	
12.....	Aseptiquement récolté	$0,2 \times 10^3$	Au-dessus de 8 h.	

* Il est vrai qu'à la place du bleu de méthylène on a recommandé d'autres indicateurs d'oxydoréduction comme le vert Janus qui

a la propriété d'avoir une couleur irréversible et la résazurine, préconisée en 1935 par RAMSDELL, JOHNSON et EVANS [2], qui vire à un potentiel plus élevé que le bleu de méthylène, donnant ainsi des résultats dans un laps de temps plus court. Mais ce colorant est beaucoup plus sensible aux laits anormaux physiologiques ou pathologiques, ce qui peut être dans certains cas, un avantage, et dans d'autres un inconvénient.

B. Evaluation de la valeur hygiénique des mêmes échantillons du lait par l'épreuve de la nitroréductase

1. La réduction des nitrates en nitrites par les germes du lait. — Comme il est bien connu, on ne trouve jamais de nitrates dans le lait normal, et, de plus, la présence des nitrites doit être exclu.

Il est certain que c'est l'eau du mouillage, qui est la cause de la présence des nitrates dans un lait [3]. Il est souvent possible de trouver dans le lait des traces de nitrites de la même source, au cas où l'eau du mouillage en contient.

Mais il est sûr que la cause stable et persistante de la présence des nitrites dans un lait ne sont que les nitrates de l'eau du mouillage, qui se réduisent par quelques microbes du lait en donnant des nitrites [1].

Selon ORLA-JENSEN, les germes du lait se distinguent en deux catégories principales : les ferments lactiques qui ne réduisent pas les nitrites et les pseudolactiques qui les réduisent.

Parmi les pseudolactiques de la famille des entérobactéries, il faut mentionner plus spécialement ceux de la tribu *Escherichia*, et principalement les *coliformes* et puis les nombreux membres des genres *Micrococcus* et *Staphylococcus*, car ces germes provoquent une réduction intense des nitrates en nitrites.

Pendant la culture de différents échantillons de lait, ont été développées plusieurs colonies, dont nous avons séparé quatre types représentatifs.

Dans le tableau n° 2 nous distinguons les colonies par leur couleur et par leur proportionnalité dans la culture.

Des germes de quatre colonies *A, B, C, D*, ont été inoculés dans du bouillon contenant 0 gr. 1% de nitrate de potassium, afin de vérifier leur qualité réductrice envers les nitrates.

Cette expérience nous a donné l'occasion de constater, parmi ces germes, une grande différence au point de vue de leur puissance à réduire les nitrates, et réciproquement à donner différents taux de nitrites dans le même laps de temps de leur incubation à 37° C.

C'est ainsi qu'après trois heures d'incubation le bouillon inoculé

par les germes des colonies *A* présentait intensivement positive la réaction des nitrites, tandis que les bouillons inoculés avec les germes des colonies *B*, *C*, *D*, et parallèlement un bouillon inoculé par des germes d'*Escherichia Coli*, ne donnèrent que faiblement positive la même réaction des nitrites.

TABLEAU II

N° de l'échantillon	Signe distinctif	Couleur	Proportion
2	A	Crème	Un peu
2	B	Blanche	Presque 50 %
2	C	Jaune	Rares
4	D	Opalescente	Presque 50 %

Inversement, après une culture de quinze heures, les bouillons inoculés avec des germes *A* ne donnaient plus que faiblement positive la réaction des nitrites, car ceux-ci avaient disparu en grande partie, et il n'en restait plus que des traces.

Dans le bouillon inoculé par les germes *B* ne se présentait aucune augmentation des nitrites. Enfin, après le même laps de temps de la culture de quinze heures, les germes *C* et *D*, et ceux des colibacilles donnaient intensivement positive la réaction des nitrites. Ce qui montre que l'action réductrice des germes *C* et *D*, et du colibacille avançait normalement, tant que leur nombre se multipliait, et par conséquent s'augmentait réciproquement le taux des nitrites.

L'examen des préparations microscopiques des germes *A*, *B*, *C*, *D*, après une coloration de Gram montra que dans la culture *A* se développaient des coques Gram positives, qui probablement étaient du genre *Staphylococcus* (sarcines). Les germes des cultures *C* et *D* étaient des bactéries Gram négatives.

Les bactéries de deux dernières cultures appartenaient au groupe des coliformes.

Ces constatations montrent la corrélation étroite et stable, qui existe entre le nombre des bactéries coliformes et le taux des nitrites qui se produisent de la réduction des nitrates.

2. La technique de la nitroréductase. — Dans la première partie de la présente étude, nous avons proposé pour la réaction de la nitroréductase l'incubation pendant un laps de temps à 37° C. d'une dilution de lait avec une solution de nitrate de potassium.

Après plusieurs expériences, nous avons changé cette technique contre une autre plus commode qui nous permet de travailler sans diluer le lait.

Nous décrirons tout d'abord la marche que nous avons suivie pendant nos recherches, et enfin une technique simplifiée de cette réaction qui peut être utile comme une méthode de routine pour l'appréciation de la qualité hygiénique d'un lait.

A. Matériel utilisé au contrôle de la réaction de la nitroréductase

1. Des tubes à essai de dimensions 160×16 , qui sont les plus usuels.
 2. Des pipettes de 5 et de 10 cm³ divisées en 1/10^e.
 3. Une étuve avec thermostat pour l'incubation.
 4. Un électrophotomètre de Leitz.
 5. Une solution à 10 % de nitrate de potassium chimiquement pur.
 6. Une solution à 1 ‰ de nitrite de potassium chimiquement pur.
 7. Une solution N/10 de permanganate de potassium.
 8. Une solution de 0 gr. 5 d'acide sulfanilique dans 150 cm³ d'acide acétique dilué (N/1).
 9. Une solution de alfa-naphtylamine. On dissout à chaud 0 gr. 20 de ce produit dans 20 cm³ d'eau distillée, on filtre et on complète avec de l'acide acétique normal à 150 cm³.
- Les solutions 8 et 9 constituent le réactif Illosvay. On les conserve séparées en des flacons bruns, bouchés à l'émeri à l'abri de la lumière.
10. Une solution à 20 % d'acide acétique glacial.

B. Comment nous avons procédé

Dans un nombre suffisant de tubes à essai, on met 0 cm³ l de la solution n° 5 de nitrate de potassium. Les tubes ainsi préparés se bouchent avec de l'ouate et se stérilisent à 180° C. pendant un quart d'heure.

Pour chaque expérience, nous avons employé 14 tubes à essai. Dans chacun d'eux, nous avons mis 5 cm³ du lait à examiner, soigneusement mesuré au moyen d'une pipette stérilisée, et après quelques légères secondes pour la dissolution des nitrates et l'homogénéisation du contenu des tubes, nous les avons portés à l'étuve à 37° C. pour l'incubation.

Après un délai d'un quart d'heure, nous avons commencé à apprécier la quantité des nitrites. Le dosage des nitrites, formés

dans les différents tubes, se répétait dorénavant chaque demi-heure pendant cinq heures et demie, depuis le commencement de l'incubation, qui durait en tout dix-huit heures, lorsque s'exécutait le dernier dosage des nitrites.

Avant le dosage colorimétrique il était nécessaire de faire une défécation du lait, fermenté, avec de l'acide acétique dilué. Le lait après l'incubation se diluait justement avec le même volume d'acide acétique (solution n° 10), se chauffait au bain-marie à 80-90° C. pendant dix minutes, et puis se filtrait. Pour prendre un filtrat parfaitement limpide, il était nécessaire de le repasser par le filtre plusieurs fois.

Pour le dosage colorimétrique avec l'électrophotomètre Leitz nous avons tracé une fois pour toutes la courbe des concentrations par des dilutions de nitrite de potassium à titre connu, préparées avec la solution stock n° 6.

L'exacte contenance en nitrites de la solution stock a été contrôlée par la solution n° 7 de permanganate de potassium.

Pour le dosage colorimétrique, on ajoute dans 5 cm³ du filtrat limpide du lait fermenté 0 cm³ 5 d'acide sulfanilique et 0 cm³ 5 de alfa-naphtylamine (solutions 8 et 9). Selon la contenance en paraît une coloration rosée jusqu'au rouge-cerise, provenant du coloré diazoaminé de la diazotation. La couleur atteint le maximum d'intensité en un quart d'heure, et il est assez stable pour plusieurs heures. Au-dessus d'une concentration des nitrites supérieure de 20 gammas il se forme un précipité, et il n'est pas possible d'apprécier la concentration des nitrites sans diluer le filtrat.

Comme nous l'avons déjà mentionné dans la première partie de notre étude (1) de laits pasteurisés, exempts d'un grand nombre de microbes, ces laits donnent tout d'abord une réaction des nitrites faiblement positive. Ces traces de nitrites proviennent de la réduction microbienne des nitrates de l'eau du mouillage souvent avant la pasteurisation. Les laits bouillis ou bien pasteurisés ne réduisent pas les nitrates.

Au cours de tous les dosages colorimétriques des nitrites aux échantillons de laits fermentés nous avons tenu compte de ce fait ; c'est-à-dire de la concentration des nitrites éventuellement trouvés dans le lait à examiner et ces taux de nitrites ont été toujours abstraits de la quantité des nitrites formés pendant l'incubation.

Il était donc nécessaire de faire toujours à chaque échantillon de lait à examiner contenant des traces de nitrites un dosage colorimétrique pour trouver leur concentration.

Il a été constaté de nos expériences que la température optimum au laps de temps de l'incubation est celle de 37° C. où les microbes d'un lait se multiplient facilement et abondamment, et par consé-

TABLEAU III
RÉSULTATS DE LA RÉACTION DE LA NITROREDUCTASE

Expériences	Laits	Temps d'incubation à 37° C. en minutes									Nombre de microbes	
		15'	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'		1.200'
		Quantités en gammas (γ) de nitrites (KNO ²) pour 5 cm ³ de lait										
1	Pasteurisé	0	1	1							3,4 × 10 ³	
2	Pasteurisé	0	0	0	0	0	0				0,55 × 10 ³	
3	Pasteurisé	0	1	0	0	1	1	1	1	1	3,8 × 10 ³	
4	Bouilli	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
5	Bouilli	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
6	Cru	1	6,5	6,5							12,8 × 10 ⁶	
7	Cru	1	2,5	2,5	12,5	25	50	12,5	12,5	12,5	4,0 × 10 ⁶	
8	Cru	0	0	1	6,5	12,5	2,5	6,5	2,5	12,5	2,76 × 10 ⁶	
9	Cru	18	25	18	50	75					35,0 × 10 ⁶	
10	Cru	18	12,5	12,5	31,5	60					28,0 × 10 ⁶	
11	Cru		6	6		12,5		50		75	2,8 × 10 ⁶	
12	Pasteurisé		1	1		1		1		12,5	4,5 × 10 ³	
13	Aseptiquement récolté	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3 × 10 ³	
14	Aseptiquement récolté	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2 × 10 ³	

quent le phénomène biocatalytique de la réduction des nitrates par les microbes est plus intense.

Au tableau III nous donnons les résultats de nos recherches pour quatorze échantillons de lait cru, bouilli ou pasteurisé, par la méthode de la nitroréductase comme nous y avons procédé.

C. Observations et critique

Dans la première partie de notre étude nous avons conclu qu'il était possible de faire l'évaluation hygiénique d'un lait par l'épreuve de la nitroréductase, en tenant compte du rapport du taux des nitrites, qui ont été produits dans le laps de temps de l'incubation où eut lieu la réduction des nitrates.

Cette conclusion s'impose dans la présente partie de notre étude par les données arithmétiques de nos recherches.

Mais, comme nous le voyons, l'allure de la réduction n'est pas toujours normale, et le taux des nitrites formés ne se trouve pas toujours proportionnel au laps du temps de l'incubation.

Nous voyons en effet que dans quelques échantillons de lait à examiner après la deuxième heure d'incubation le taux des nitrites diminue curieusement malgré le grand nombre initial des microbes, ce que nous avons constaté par la numération microbienne en boîtes de Pétri.

On doit donc discuter ces anomalies.

En examinant les courbes les plus représentatives qui montrent le taux des nitrites en fonction du temps écoulé pendant l'incubation des laits, nous constatons ce qui suit :

1. Les courbes provenant de l'incubation de lait pasteurisé sont à peu près des lignes droites pour un grand délai du temps de l'incubation. Les taux des nitrites commencent à augmenter intensément depuis la dix-huitième heure. Seulement, quand un lait pasteurisé contient assez de coliformes, sa courbe commence à augmenter de façon stable à partir de la quatrième ou cinquième heure.

2. Les courbes 7 et 8 proviennent de deux échantillons de lait cru d'une usine de pasteurisation. Dans ces deux cas, nous observons que les taux des nitrites dans le n° 7 (nombre des microbes 4×10^6) augmentent dans les premières 30 minutes jusqu'à 2,5 gammas, tandis que dans le n° 8 (nombre des microbes $2,76 \times 10^6$) dans le même temps, les nitrites ne dépassent pas 1 gamma. Au cours des heures suivantes l'allure de ces courbes change et le taux des nitrites dans le n° 7 devient deux fois plus grand.

En continuant d'observer l'allure de ces deux courbes nous voyons qu'après quelques oscillations les nitrites atteignent un maximum dans les deux jusqu'à deux et demi premières heures. Dans ce moment le rapport du taux des nitrites est à peu près le même avec le rapport du nombre des microbes. Les taux des nitrites n'augmentent plus qu'après la cinquième à sixième heure pour donner enfin dans le laps de dix-huit heures de grandes quantités de nitrites.

3. Les courbes 9 et 10 proviennent aussi de deux échantillons de lait cru de la même usine de pasteurisation. L'allure de ces courbes n° 9 (nombre de microbes 35×10^6) et n° 10 (nombre de microbes 28×10^6) est à peu près la même. Après quelques oscillations d'augmentations et diminutions du taux des nitrites les deux courbes commencent à augmenter de manière stable.

4. Assez intéressant est aussi le lait n° 6. Il s'agit encore d'un échantillon de lait cru de la même usine de pasteurisation (nombre de microbes $12,8 \times 10^6$). Depuis la première demi-heure, le taux des nitrites augmente de 1,0 à 6,5 gammas.

5. L'allure de la courbe de l'échantillon de lait n° 11 (nombre de

microbes $2,8 \times 10^6$) présente aussi une augmentation stable du taux des nitrites.

Comme nous le voyons par ces exemples, le taux des nitrites qui se forment dans le laps d'incubation d'un lait n'est pas toujours proportionnel au nombre initial des microbes du lait. Nous ne pouvons donc conclure qu'un nombre déterminé de microbes donnera une quantité réciproque des nitrites, car la puissance à réduire les nitrates des différents germes pseudolactiques oscille dans de vastes limites.

Comme nous l'avons déjà mentionné, des colonies développées dans les cultures de différents échantillons de lait donnent des germes dont l'action réductrice des nitrates n'est pas la même pour tous.

C'est ainsi que lorsqu'il existe, dans un lait, une prédominance des germes du genre des coques (colonies A), le maximum du taux des nitrites se présente dans le laps de deux à trois heures.

Inversement, lorsque les coliformes augmentent et que leur nombre atteint 30 % du nombre initial des microbes d'un lait, on observe dans les premières trois heures de l'incubation de petites oscillations (augmentations et diminutions) du taux des nitrites, mais après ce délai de temps les nitrites commencent à augmenter de manière régulière.

Nous rencontrons le premier cas dans des laits crus, mais plus souvent dans du lait pasteurisé.

Donc l'allure de la réduction des nitrates dans le laps de temps de l'incubation dépend :

1. Du nombre total des microbes contenus dans le lait à examiner.
2. Du rapport des différents germes pseudolactiques qui constituent en majorité la pollution microbienne d'un lait, c'est-à-dire, de la relation existant entre le nombre des coques et celui des coliformes.

Dans le phénomène biocatalytique, comme celui de la réduction des nitrates en nitrites par les différents microbes existant dans un milieu comme le lait, on ne doit pas oublier l'action antagoniste des microorganismes et son potentiel d'oxydoréduction, sur lequel agissent la plupart des microbes de lait.

Malgré ces constatations, nous pouvons sûrement certifier que la méthode de la nitroréductase est un critérium très important dans l'évaluation hygiénique d'un lait, car il existe une corrélation du taux des nitrites et du nombre des microbes d'un lait. C'est presque à la deuxième heure depuis le commencement de l'incubation d'un lait nitraté que l'on peut dire que le nombre des microbes

du lait se trouve dans un rapport de proportionnalité au taux des nitrites formés dans ce laps de temps.

Quoique nous ne puissions pas traduire rigoureusement ces taux des nitrites en chiffres, autrement que dans le cas où les microbes du lait sont en majorité des coliformes, il est possible de déduire approximativement du taux des nitrites existant dans la deuxième heure de l'incubation du lait le nombre initial des microbes.

Réciproquement, du nombre approximatif des microbes on peut évaluer la valeur hygiénique du lait à examiner, en admettant une quelconque classification analogue à celle de la réductase.

D. La nitroréductase comme méthode de routine

Dans un tube à essai qui doit être aseptique, on introduit 0 cm³ 1 d'une solution stérilisée de nitrate de potassium à 10 %, et ensuite on mesure avec une pipette stérile 10 cm³ du lait à examiner. On bouche avec de l'ouate et, après quelques légères secousses pour la dissolution des nitrates et l'homogénéisation du contenu, on porte le tube au bain-marie, ou à l'étuve, à 37-40° C.

Après un laps de deux heures d'incubation, on dilue le lait exactement avec un égal volume d'acide acétique dilué à 20 %, on filtre pour prendre un liquide limpide, et on procède au dosage colorimétrique des nitrites avec le réactif Illosvay.

Si l'on ne dispose pas d'un colorimètre, on fait la comparaison de la teinte avec une gamme de différentes dilutions de nitrite de potassium. On prépare cette gamme en commençant par des dilutions de 0,5 gammas de nitrite de potassium à 5 cm³ du liquide étalon et on continue la série suivante des dilutions : 1, 1,5, 2,0, 5,0, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100 gammas de nitrite pour les 5 cm³ du liquide étalon.

Avant l'incubation on doit faire une recherche qualitative des nitrites du lait, et s'il en contient, on procède à leur dosage. Ce taux des nitrites doit être soustrait de la quantité des nitrites qui se produisent pendant l'incubation de deux heures.

E. Classification des laits selon les résultats de la nitroréductase

Dans le tableau suivant nous donnons d'abord une image de la proportionnalité approximative du taux des nitrites provenant de la réduction des nitrates dans le délai de deux heures d'incubation et du nombre des microbes des laits examinés. Nous donnons aussi quelques chiffres concernant le nombre des colibacilles dans des échantillons où ont été numérés les coliformes.

TABLEAU IV

Nitrite de potassium en gammas pour 5 cm ³	Nombre total des microbes	Nombre des coliformes
0	$0,55 \times 10^3$	
1	$3,80 \times 10^3$	
1,5	$4,50 \times 10^3$	3×10^3
12,5	$2,75 \times 10^6$	7×10^5
25,00	$4,00 \times 10^6$	8×10^5
50,00	$28,00 \times 10^6$	
75,00	$35,00 \times 10^6$	

Pour la classification de la qualité hygiénique des laits nous avons accepté quatre qualités : 1° bonne, 2° médiocre à mauvaise, 3, très mauvaise, 4° extrêmement mauvaise. Le tableau suivant représente la corrélation de ces quatre qualités : 1° au nombre des microbes du lait ; 2° au temps de la décoloration du bleu de méthylène ; 3° au taux des nitrites en gammas pour 5 cm³ du lait examiné.

TABLEAU V

Qualités	Nombre de microbes	Temps de réductase	Nitrites en gammas
Bonne qualité	0 — 5×10^5	— 330'	1
Médiocre à mauvaise	10^5 — 4×10^6	120 — 330'	25
Très mauvaise	10^6 — 20×10^6	15 — 120'	50
Extrêmement mauvaise....	Au-dessus de 10^6	— 15'	75

En ce qui concerne la qualité hygiénique d'un lait cru ou pasteurisé il est très important de noter que le taux des nitrites provenant de l'eau du mouillage peut souvent dépasser la limite dangereuse, surtout quand l'eau du mouillage est souillée par une grande quantité de nitrates d'origine fécale, etc.

Il s'agit, vraiment, d'un grand danger pour l'âge infantile spécialement, car les nitrites sont absorbés par les globules rouges du sang et provoquent une méthémoglobinémie, suivie des phénomènes de cyanose et d'asphyxie.

NOTE

Nous avons déjà publié un Mémoire préliminaire sur la méthode de la nitroréductase et, par cette seconde partie de notre étude, chiffré les résultats obtenus quant à l'interprétation relative à la qualité hygiénique des laits examinés, lorsque nous avons lu dans le n° 288 du « Lait », l'important mémoire de L. M. BURUIANA et Anne IDICEANO, sous le titre : Sur la présence des nitrites dans le lait et leur signification. La détermination du « *Coli*-titre » par réduction des nitrates.

Nous sommes heureux en constatant qu'il n'existe pas de grande différence en ce qui concerne les conclusions des auteurs mentionnés et les conclusions qui résultent de notre étude. Le grand nombre des coliformes dans les laits examinés par eux est certainement la cause importante qui doit justifier leur conclusion en ce qui concerne la corrélation du taux des nitrites et du nombre des coliformes, c'est-à-dire de l'appréciation du contenu en colibacilles par le dosage des nitrites résultant de la réduction de nitrates ajoutés au lait.

Conclusions

Après avoir étudié quantitativement l'allure du phénomène biocatalytique de la réduction des nitrates, ajoutés à différents échantillons de lait cru bouilli ou pasteurisé, en nitrites par l'action réductrice des microbes du lait, nos conclusions sont les suivantes :

1. Le lait frais normal recueilli aussi aseptiquement que possible ne présente la réduction des nitrates qu'après une longue incubation de dix huit heures à 37° C.

De même, le lait récemment bouilli perd la propriété réductrice, parce que la température de l'ébullition a tué les microbes. De même le lait pasteurisé est privé de l'action réductrice.

2. Les laits produits avec trop peu de soin produisent, après une incubation de deux heures, un taux de nitrites approximativement proportionnel au nombre des microbes contenus dans le lait.

3. L'épreuve de la nitroréductase rend compte de l'état microbien du lait, et même mieux que la numération microbienne ; il peut donc être utile à l'évaluation hygiénique des différents laits crus ou pasteurisés. Pour ce but nous classons en quatre qualités les différents laits :

1^o bonne, 2^o médiocre à mauvaise, 3^o mauvaise, 4^o extrêmement mauvaise, en tenant compte du taux des nitrites trouvés par le dosage colorimétrique après deux heures d'incubation à 37° C.

4. Il n'est possible d'apprécier le « colititre » d'un lait d'après le taux des nitrites, que seulement dans le cas où les coliformes constituent la majorité des microbes du lait examiné.

5. L'allure de la réaction de la nitroréductase donne précisément la possibilité de prouver si, dans le lait examiné, les coliformes constituent ou non la majorité des microbes du lait.

6. L'épreuve de la nitroréductase est une méthode plus sûre et plus rapide que celle de la réductase.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] C. G. MACRIS et C. G. TZIVANOPOULOS. Contribution au contrôle bactériologique du lait. *Agrotiki Epithéorissis* (en langue grecque), juillet-août, 1949.
- [2] *Journal of Dairy Science*, 1935, **18**, 705.
- [3] A. ROCHAIX et A. TAPERNOUX. Le lait et ses dérivés, Paris-Lyon, 1948.

DÉTERMINATION DE LA TENEUR EN MATIÈRE GRASSE DES FROMAGES, AU MOYEN DU BUTYROMÈTRE GERBER (1)

par

A. GRANVILLE

Chargé de cours à l'Ecole
de Médecine vétérinaire,
à Cureghem

et

F. DESMET

Ingénieur des Industries Agricoles
A.I.Gx
Chimiste au Laboratoire Inter-
communal de Bruxelles

La simplicité de la méthode Gerber, pour la détermination de la matière grasse dans le lait, nous a conduits à essayer d'en étendre l'application à d'autres produits laitiers, notamment aux fromages.

La méthode acido-butyrométrique de dosage de la matière grasse dans les fromages n'est certes pas neuve, mais jusqu'à présent on utilisait les butyromètres spéciaux de Van Gulik. Ce procédé présente un inconvénient : la dissolution du fromage logé dans un petit godet perforé, placé dans l'ouverture d'un bouchon en caoutchouc, est parfois laborieuse. Il nous est arrivé maintes fois de devoir faire séjourner pendant plusieurs heures au bain-marie, même en procédant à de fréquentes agitations, des fromages à pâte dure tels que Gruyère, Chester, Hollande, etc.

Il nous a donc paru intéressant d'étudier un procédé se basant sur les mêmes principes, mais d'application plus simple et surtout plus rapide.

(1) *Annales de Médecine Vétérinaire* (Bruxelles), 1951, n° 1, 31.