LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

MÉMOIRES ORIGINAUX :		2 ^o Journaux, Revues, Sociétés savantes	59
G. THIEULIN. — Anniversaire	1	3 ^o Brevets	110
J. JACQUET et F. CHARTON. — La recherche des antibiotiques dans le lait par biophotométrie	2	BULLETIN BIBLIOGRAPHIQUE :	
C. MADELMONT et G. MICHON. — La pollution radioactive du lait dans l'agglomération parisienne	19	1 ^o Livres	117
M. SWIRSKI, R. ALLOUF et H. CHEFTEL. — Contribution à l'étude de l'action de la chaleur sur les caséines (2 ^e partie)	28	2 ^o Journaux, Revues, Sociétés savantes	118
REVUE :		3 ^o Brevets	124
G. GÉNIN. — Le lait dans le monde	41	DOCUMENTS ET INFORMATIONS	
BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE :		La recherche agronomique	125
1 ^o Les livres	51	Le Marché des fromages en Autriche	126
		Statistiques laitières du Danemark pour 1962	127
		Nouvelles de Grande-Bretagne	127
		Industrie laitière au Kenya	128
		73 ^e Concours général agricole	128

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

LA RECHERCHE DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT PAR BIOPHOTOMÉTRIE

par
JEAN JACQUET et FRANK CHARTON
Professeur Assistant
de Microbiologie à la Faculté des Sciences de Caen

I. — INTÉRÊT ACTUEL DE LA RECHERCHE DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

Dès le début de l'utilisation de l'antibiothérapie pour traiter les mammites des vaches laitières, l'un de nous [10], [14] décrivait les accidents provoqués en fromagerie de camembert par la présence de substances antimicrobiennes qui exercent un effet sélectif sur la flore, tandis que MOCQUOT, CHEVALIER et leurs collabora-

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

teurs [20], AUCLAIR [1] entre autres, signalaient des accidents analogues en matière de pâtes fermes. La question paraissait avoir perdu quelque peu de son actualité et dans un travail récent d'enquête, portant sur trois régions d'élevage (Ille-et-Vilaine, Charentes, Jura) où un grand nombre d'échantillons de lait ont été analysés, P. MOREL [22, 23] va jusqu'à prétendre que cette présence est devenue actuellement très rare.

Or, du point de vue statistique, deux méthodes nous sont offertes pour nous faire une opinion :

1° La fréquence d'apport aux usines de bidons munis d'une étiquette spéciale et pour lesquels, le cultivateur convient lui-même, et l'annonce formellement, qu'il y a des antibiotiques dans son lait.

2° Un sondage effectué par analyses d'un aussi grand nombre que possible d'échantillons de lait livrés aux usines.

Dans le premier cas, c'est 2 à 4 p. 100, rarement 5 p. 100 des bidons qui arrivent ainsi à des Coopératives de Normandie dont nous avons interrogé les directeurs. Dans une très importante note, M. LEMAITRE [18] rend compte de la présence de pénicilline dans les laits de ramassages effectués pendant deux ans à la Coopérative Laitière d'Elle et Vire. Les proportions de laits contaminés signalés comme tels par les producteurs oscillent entre 0,4 p. 100 en septembre et 3 p. 100 en hiver, avec, entre les deux, des valeurs moyennes de 1 à 1,5 p. 100.

Dans le deuxième cas, tout dépend de la valeur de la méthode choisie, celle-ci devant être sensible et parfaitement constante. On peut donc se demander si le test adopté justement par M. MOREL ne l'exposait au risque de dormance des spores, d'où des réponses irrégulières. Sa sensibilité, par ailleurs, si elle est suffisante pour mettre à l'abri d'accidents survenant en matière de fromages comme le Camembert, qui demandent, pour se produire, un taux élevé d'antibiotiques dans le lait, ne suffit pas à déceler des doses plus faibles qui empêcheraient ou gêneraient gravement une fabrication de yaourts. Notons, en tout cas, la divergence très grande des résultats statistiques de M. MOREL (0,4% des laits) avec ce qui est trouvé partout ailleurs. Nous devons donc considérer ce laborieux travail, non pas comme une mise au point définitive, mais comme une simple opinion apportée à un débat qui n'est pas terminé. Aussi, n'est-il pas inutile de revenir sur la question des méthodes, comme nous nous proposons de le faire ici.

On peut dire que, suivant ce que l'on veut obtenir, on pourra avoir recours à des procédés différents, dont on exigera des qualités substantielles qui ne seront pas du tout les mêmes :

- rapidité de réponse et simplicité du test pour le tri à l'usine ;
- qualité des renseignements pour les recherches plus fines de laboratoire, et là, la longueur du temps d'incubation est moins inquiétante.

Les techniques proposées sont évidemment très nombreuses et reposent sur des moyens variés de mise en évidence des effets des antibiotiques. Citons-en trois grands types :

a) On peut, tout d'abord, rechercher les modifications morphologiques de certains germes et notamment ceux des yaourts, examinés sous le microscope, modifications utilisées, par exemple, par GALESLOOT [5] [6].

b) On peut, aussi, noter l'arrêt de croissance en milieu liquide d'une souche sensible : *Streptococcus lactis*, *S. thermophilus*, *Lactobacillus yoghurtii*... Divers colorants dont la réduction retardée témoigne de l'arrêt d'acidification ont été proposés pour faciliter la lecture : teinture de tournesol, bleu de méthylène, résazurine, chlorure de triphényltétrazolium, etc. Nous pouvons ranger dans ce groupe les procédés de AUCLAIR [1], DOPTER [3], [4], LEMOIGNE, SANCHEZ et GIRARD [19], PIEN, LIGNAC et CLAUDE [25], NEAL et CALBERT [24], SANCHEZ et LAMENSANS [26].

L'emploi concomitant de souches résistantes adaptées, d'une enzyme (pour la pénicilline), permettent la diagnose de l'antibiotique en cause.

c) On peut se servir, enfin, de l'arrêt de croissance d'une variété sensible dont la culture est étalée sur milieu solide. La place du lait est alors variable : il peut occuper des cupules, des cavités creusées dans la gélose, imprégner des disques de papier, former un extrait solide déposé à l'instar d'une pastille. Des colorants peuvent encore être ajoutés. Quant au choix du germe, il est toujours très ouvert : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus*, etc. Ce sont les techniques de KOSIKOWSKY et MOCQUOT [17], de KOSIKOWSKY seul [16], commercialisées par la puissante maison Difco [2], SILVERMAN et KOSIKOWSKY [27], IGARASHI et ses collaborateurs [8], GALESLOOT et HASSING [7].

Il y a dix ans, en collaboration avec M^{me} STEEG [12], [13], alors que les docteurs-vétérinaires ne se servaient que de trois antibiotiques, nous avons mis au point une méthode de culture utilisant trois germes microbiens qui nous permettaient, non seulement, de faire la diagnose précise, mais encore, de titrer le taux d'antibiotique présent dans l'échantillon analysé. Le procédé pouvait aussi bien être mis en route en plaçant dans la cavité

centrale de la gélose du caillé ou du fromage (fig. 1) au même titre que du lait ou du lactosérum. On nous a reproché [22] de ne pouvoir lire nos résultats qu'après dix-huit heures d'incubation. C'est inexact ; ce que nous avons écrit, c'est : « nous lisons nos résultats au bout de dix-huit heures », ce qui n'est pas du tout la même chose et ceci, pour des raisons bien simples : l'ensemencement est fait dans l'après-midi au laboratoire et le résultat constaté et interprété le lendemain matin. En fait, la lecture peut parfaitement se faire au bout de six heures.

Fig. 1. — Recherche d'un antibiotique dans du yaourt, selon la méthode des cavités dans la gélose (JACQUET et M^{me} STEEG, 1952). La surface totale de la boîte de Pétri a été ensemencée avec *Staphylococcus aureus* Oxford, et le yaourt suspect placé dans la zone centrale. L'antibiotique présent dans le lait fermenté diffuse à partir de la cavité et empêche, sur une zone en anneau d'autant plus grande que la concentration est plus élevée, le germe de pousser.

Quelle que soit la technique retenue, on concilie très difficilement à la fois la rapidité et la sensibilité de la réponse. Il faut donc savoir ce que l'on veut et choisir suivant les circonstances.

Or, celles-ci dépendent de nombreux facteurs, notamment du type même des fabrications réalisées. C'est ainsi que seuls MOHR et KOENEN [21] ont observé une difficulté de fabrication des beurres. En réalité, dans la quasi-unanimité des cas, l'inhibition de la maturation des crèmes ne donne qu'un beurre d'arôme moindre, mais n'empêche pas absolument la fabrication. Il n'en

est plus ainsi, lorsque l'activité de la fermentation lactique est vraiment essentielle, jouant un rôle prépondérant dans la technologie même. C'est le cas des aliments microbiens, comme les fromages, ou les laits fermentés. En ce qui concerne les Camemberts de Normandie, l'un de nous a établi que l'arrêt de la fermentation lactique ne produisait d'accident qu'à partir d'une certaine concentration en substance antimicrobienne, 150 U.I. par litre (soit 0,15 par ml) de pénicilline, lorsque les premiers essais eurent lieu, il y a plus de dix ans [14]. La question a évolué, depuis, et la gravité des accidents s'est beaucoup atténuée; leur fréquence également, du même coup. En fait, nous avons pu montrer [15], il y a quatre ans, que n'avaient guère subsisté maintenant, que les ferments lactiques les plus résistants et, pour obtenir un accident en fromagerie de la même gravité qu'autrefois, il fallait qu'il y eût près de 450 U.I. par litre (soit 0,45 par ml) de la même pénicilline.

Mais la préparation du Camembert est loin de représenter la fabrication la plus fragile, celle des laits fermentés l'étant considérablement plus. Et là, on peut dire que l'acuité du problème n'a en rien diminué. Un directeur de coopérative laitière de la région parisienne nous a fait savoir que, surtout pendant les mois de janvier à mars, il lui était radicalement impossible de fabriquer des yaourts pendant trois à quatre jours par mois avec le lait qu'il collecte. De notre côté, depuis la parution de notre note initiale sur l'emploi de la biophotométrie [11], l'un de nous a été consulté par une fabrique de yaourts de la Manche. Il s'agissait d'un accident apparu brusquement et qui durait depuis plusieurs jours, présentant les caractéristiques suivantes : des yaourts, au bout de peu de temps, le lactosérum sortait abondamment; le caillot se décollait des pots; il se formait ensuite une attaque de la caséine, avec apparition d'un goût très net de peptone et début de digestion du caillé qui diminuait de volume et nageait dans le sérum. L'examen, après coloration, montra que la flore était formée essentiellement de lactobacilles, avec disparition à peu près totale des Streptocoques thermophiles (fig. 2). Ceci explique qu'il y ait encore une acidification, mais que l'on constate aussi une importante protéolyse, *Lactobacillus yoghurti* et *bulgaricus* étant bien connus par l'action de leurs protéases. Tout se passe comme si une substance réalisait une sélection des germes, inhibant les coques et laissant survivre les bâtonnets. Il est évident, d'après l'aspect de ceux-ci sous le microscope, qu'il doit s'agir d'antibiotique : en effet, le gonflement de la gaine d'enveloppe et les diverses formes de souffrance sont caractéristiques. La preuve en est effectuée facilement. Par la méthode des cavités, mise au point autrefois [12], [13] (fig. 1),

Fig. 2. — Sur les quatre photographies du bas, examen microscopique, après coloration au bleu de méthylène, d'un yaourt fabriqué avec du lait renfermant de la streptomycine montrant la disparition presque totale des streptocoques thermophiles et les formes anormales prises par les lactobacilles. En haut, par comparaison, examen, dans les mêmes conditions, d'un yaourt normal présentant un équilibre correct des coques et bâtonnets.

on montre très aisément que l'hypothèse est exacte et qu'il s'agit de streptomycine au taux de $2\text{ }\mu\text{g}$ par ml. En effet, du fragment de yaourt placé dans la zone centrale de la boîte de Petri d'épreuve, un antibiotique diffuse dans la gélose et gêne la croissance du *Staphylococcus aureus* Oxford ensemencé en surface. Ce n'est pas de la pénicilline, car une contre-épreuve entreprise dans des conditions analogues, à cette différence près que l'on a ajouté de la pénicillinase intimement mélangée au fragment de yaourt placé au centre de la boîte, donne une zone d'inhibition de la culture du même diamètre. Au contraire, l'ensemencement d'une troisième boîte de Petri, avec une souche microbienne résistante à la seule streptomycine, ne montre aucune gêne de croissance et le staphylocoque adapté pousse jusqu'au bord de la cuvette centrale. Enfin, la mesure du diamètre d'inhibition de la figure 1 reportée sur un graphique étalonné précédemment, établissant l'effet de diverses concentrations de la streptomycine, dans les conditions précises utilisées sur la souche Oxford dont nous nous servons, permet de connaître la quantité d'antibiotique qui existe dans le yaourt raté.

L'industriel intéressé a, tout d'abord, accepté nos commentaires avec une certaine réticence, parce qu'il avait sélectionné six fournisseurs de confiance dont il était sûr et qui affirmaient ne jamais utiliser d'antibiotique. La vue de nos photographies 1 et 2 l'ébranla quelque peu dans ses convictions et il accepta le principe, si l'accident se reproduisait, de faire un contrôle simple du lait des fournisseurs par la méthode de SANCHEZ et LAMENSANS [26]. Il ne fallut pas attendre longtemps : très vite, l'agriculteur fautif fut localisé et déclara utiliser des crayons antibiotiques pendant tout le temps où il tarissait ses vaches, « pour qu'elles n'aient pas de mammites à la lactation suivante ».

De toutes façons, nous pensons que la question n'est pas seulement pratique et d'incidence technologique : le lait et les produits qui en dérivent étant destinés à l'alimentation des hommes et surtout des enfants, ne doivent pas renfermer de substances étrangères, notamment d'antibiotiques. Les cas de sensibilisation allergique que l'on a signalés, par-ci par-là, sont inquiétants en principe et nous rappelons simplement ce que l'un de nous écrivit en 1952 [9] : « Après avoir envisagé les conséquences que pourrait avoir la présence des antibiotiques dans le lait, aussi bien en ce qui concerne l'hygiène du consommateur qu'en ce qui a trait aux industries laitières, il nous semble logique de souligner que le lait chargé d'antibiotiques devrait être « hors commerce », à moins que l'acheteur n'en soit dûment averti. L'antibiotique, en effet, a été utilisé par le propriétaire des animaux parce qu'il les supposait

atteints de mammite... Ce qui est essentiel, c'est de ne pas perdre de vue que le lait est d'abord un tissu, un produit biologique, et qu'il faut tout faire pour lui conserver sa pureté initiale ; et c'est une mauvaise politique que de tolérer des additions de substances variées, même prétendues sans danger. De ce point de vue, la présence des antibiotiques dans le lait livré au commerce doit être considérée comme une falsification, au même titre que l'adjonction d'antiseptiques. »

II. — MISE AU POINT DE LA RECHERCHE ET DU TITRAGE DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT, PAR BIOPHOTOMÉTRIE

Contrairement à ce qui a été soutenu par d'autres, il nous paraît que la question de la recherche des antibiotiques dans le lait n'a pas tellement perdu de son intérêt. Nous avons donc tenté d'utiliser à cet effet la cinétique de croissance microbienne, comme celle qui est donnée par le biophotomètre de Bonet-Maury (fig. 3).

Fig. 3. — Biophotomètre de Bonet-Maury. (Cliché aimablement communiqué par les Etablissements Jouan.)

Il nous fallait, pour cela, connaître, tout d'abord, la répartition de l'antibiotique entre caillot et lactosérum, car l'appareil ne peut travailler qu'avec un milieu transparent. Il fallait s'assurer, ensuite, que le lactosérum était un milieu convenable pour les germes choisis comme révélateurs de la présence de l'antibiotique, car c'est le lactosérum de chaque échantillon qui va être directementensemencé.

1° Répartition des antibiotiques entre caillot et sérum.

Pour étudier le pourcentage d'antibiotique qui passe dans le lactosérum, nous avons retenu la méthode des cavités [12], [13]

ménagées dans la gélose Heatley coulée dans une série de boîtes de Pétri etensemencées avec *Staphylococcus aureus* Oxford. On introduit au centre des différentes boîtes 1 ml de chaque concentration d'antibiotique dans le lait d'une gamme étalon. On opère de même pour le caillé et pour le lactosérum qui ont été séparés par centrifugation. Après incubation à l'étuve à 37° C pendant douze heures, on lit les résultats en mesurant le diamètre des halos clairs, représentant les zones où la souche microbienne, sensible à l'antibiotique n'a pas poussé. On exprimera graphiquement les sensibilités du *Staphylococcus aureus* Oxford aux différents antibiotiques, en portant en ordonnées les diamètres des zones d'inhibition et en abscisse les logarithmes de la concentration de l'antibiotique.

Nous avons répété un grand nombre de fois les essais sur deux antibiotiques (Pénicilline = 50 expériences ; Streptomycine = 30) et pratiqué un peu plus d'une dizaine d'essais pour chacun des six produits suivants : Auréomycine ; Tétracycline ; Terramycine ; Erythromycine ; Chloramphénicol ; Nitrofurazone et Solu-Furax, en mélange à parties égales.

(Cliché C. R. Acad. Agric.)

Fig. 4. — Répartition de la pénicilline, d'une part dans le lait (courbe 1), d'autre part dans le lactosérum (courbe 2) et dans le caillé (courbe 3) qui en proviennent.

— En ordonnées : dimensions des zones d'inhibition en mm sur la gélose, selon la technique représentée dans la figure 1 ;

— En abscisses : teneur en pénicilline, en U.I./ml.

Pour les produits étudiés et pour une même concentration dans le lait initial, il passe très légèrement plus d'antibiotique dans le lactosérum que dans le caillé (cf. fig. 4), mais on est très proche, de toutes façons, de ce qui existait dans le lait initial.

2° Possibilité de culture des germes dans le lactosérum.

Nous avons suivi comparativement les courbes de croissance de plusieurs espèces microbiennes, retenues par d'autres auteurs, notamment *Bacillus subtilis*, *B. megatherium*, *Staphylococcus aureus*. Nous constatons, tout d'abord, que pour une même souche, les cinétiques sont meilleures, quand on réalise l'ensemencement à

(Cliché C. R. Acad. Agric.)

Fig. 5. — Courbes de croissance de différents germes dans le lactosérum.
Courbe 1 : Staphylocoque doré provenant d'une culture en bouillon de viande peptoné.

Courbe 3 : *Bacillus subtilis* provenant d'une culture en bouillon.

Courbe 4 : *Bacillus subtilis* provenant d'une culture sur gélose.

Courbe 6 : Staphylocoque doré provenant d'une culture sur gélose.

— En ordonnées : graduation du biophotomètre de Bonet-Maury.

— En abscisses : le temps en heures.

partir d'une culture en bouillon plutôt que sur gélose (v. courbes 4 et 6 de la figure 5 par rapport aux courbes 1 et 3). Nous remarquons, ensuite, que le staphylocoque Oxford convient particulièrement bien, grâce à sa sensibilité à tous les antibiotiques, à sa rapidité de multiplication, à sa fixité dans le temps et sa facilité d'obtention et de conservation.

On aurait pu penser qu'il était possible d'améliorer la croissance en ajoutant au lactosérum divers facteurs favorisant : la cobalamine, la biotine, la nicotinamide n'apportent aucune amélioration. Le lactosérum est donc suffisant à lui seul pour assurer la pousse microbienne recherchée, tout au moins avec les espèces précitées.

En principe, on cultive le staphylocoque à 37° C. Or, nous désirons obtenir une réponse aussi rapide que possible ; aussi, avons-nous, après diverses tentatives, choisi 33° C, qui nous a donné de bons résultats et permet de perdre moins de temps à chauffer l'appareil.

3° Etablissement des courbes de référence.

Au début du fonctionnement de l'appareil, les milieux contenus dans les cuves du biophotomètre doivent être clairs et limpides. Le galvanomètre sera réglé sur 100 et fera inscrire, par l'intermédiaire d'un stylet, 6 points sensiblement au même endroit pour les six cuves.

Au bout d'un certain temps de fonctionnement, les cultures pourront croître dans les six cuves et ces milieux deviendront alors de plus en plus troubles et opalescents. L'intensité de la lumière traversant ces milieux va être de moins en moins forte ; elle sera recueillie par une cellule photo-électrique et transmise au galvanomètre qui aura tendance à revenir vers le zéro : on aura ainsi, au fur et à mesure, une série de points sur la feuille enregistreuse, ces points traduisant des courbes de croissance microbienne par rapport au temps.

La première cuve sert de témoin et ne reçoit que du lactosérum pur. Dans chacune des autres cuves, nous introduisons 5 ml de lactosérum contenant les différents antibiotiques dont les diverses concentrations ajoutées au lait initial sont connues et nous commençons ces milieux avec la souche microbienne sensible choisie, à raison de 3 p. 100 (c'est-à-dire 0,15 ml). Nous réglons l'appareil, le laissons marcher, puis lisons les résultats. Pour obtenir des courbes solidement établies, on répète ces essais un grand nombre de fois.

En vue encore de gagner du temps, en évitant le délai de latence de démarrage de la culture, celle-ci est faite en introduisant un

inoculum en pleine phase logarithmique de croissance, c'est-à-dire qui est à 3 h 30 à 4 heures de multiplication, dans un tube de bouillon de viande peptoné.

4° Technique d'analyse.

L'appareil est mis à chauffer pendant 30 mn, avant la mise en route de l'analyse, afin que tout le dispositif soit bien parvenu à 33° C.

Les échantillons de lait à analyser (20 ml) sont additionnés de 1 ml de présure au 1/10 000 diluée au 1/10 et placés dans un bain-marie à 100° C. Ils coagulent aussitôt. Ils sont centrifugés à 3 000 tours par minute et le lactosérum clair est décanté, puis filtré sur bougie stérile L 3. Cette préparation est terminée en moins d'une demi-heure.

a) *Test de démonstration d'une substance antibactérienne dans le lait (test de présomption de la présence d'un antibiotique).*

Dans la première cuve, on place 5 ml d'un lactosérum témoin, provenant d'un lait sûrement exempt d'antibiotique, dans les cinq autres, cinq lactosérums d'échantillons à étudier (à raison de 5 ml par cuve). Tous sontensemencés avec 0,15 ml d'une culture liquide de staphylocoque Oxford de 3 h 30 ; puis, l'appareil est réglé.

La lecture peut être effectuée, dans les cas très favorables, au bout de 1 h 30 ; dans les cas favorables, en deux heures ; sinon, au bout de trois heures. On ne constate que l'arrêt de croissance, sans pouvoir préciser de quelle substance il s'agit. Mais, du point de vue industriel, cela suffit largement pour trier des lots de lait différents et réserver aux fabrications particulièrement sensibles les seuls échantillons sans inhibiteurs des microbes (fig. 7).

b) *Diagnose de l'antibiotique et appréciation de sa teneur.*

La première cuve reçoit encore le sérum témoin. Dans la deuxième, on place le lactosérum du lait à analyser ; dans la troisième, ce même lactosérum et 2 gouttes d'une solution suffisamment concentrée de pénicillinase ; dans la quatrième, la cinquième, la sixième, toujours le même lactosérum à analyser. Les trois premières cuves sontensemencées avec la souche de staphylocoque Oxford sensible aux antibiotiques ; la quatrième avec une souche du même germe, adaptée à résister à la streptomycine, la cinquième avec une souche résistante à l'auréomycine, etc. On transpose ainsi en

biophotométrie, la méthode préconisée par LEMOIGNE, SANCHEZ et GIRARD [19], utilisée ensuite par PIEN et LIGNAC, d'une part [25], par DOPFER, de l'autre [3], [4]. Pour assurer une reconnaissance précise, il faut, cette fois, examiner un nombre d'échantillons de lait beaucoup plus faible que pour le test présomptif.

La diagnose est assurée par la nature de la cuve où la croissance bactérienne est rétablie ou s'approche tout au moins de celle du témoin : cuve n° 3 (renfermant de la pénicillinase, cf. fig. 6) dans le cas de la pénicilline). Quant à la teneur, elle est appréciée par la position de la courbe d'inhibition de la cuve 2 par rapport aux courbes de références établies précédemment, pour chaque anti-

Fig. 6. — Influence de la pénicilline sur la culture du *Staphylocoque doré*, souche Oxford, en lactosérum.

Courbe 1 : croissance normale du *staphylocoque* Oxford sans antibiotique.

Courbe 2 : croissance en présence de 0,02 U.I./ml.

Courbe 3 : croissance en présence de 0,02 U.I./ml plus pénicillinase.

Courbe 4 : croissance en présence de 0,04 U.I./ml.

Courbe 5 : croissance en présence de 0,005 U.I./ml.

Courbe 6 : croissance en présence de 0,005 U.I./ml plus pénicillinase.

— En ordonnées : graduation du biophotomètre de Bonet-Maury ;

— En abscisses : le temps en heures.

biotique. En cas de nécessité, on intrapolera (courbe 6, par exemple, de la fig. 8, où l'on estimera la teneur en streptomycine à 1,5 $\mu\text{g/ml}$).

5° Choix de la souche microbienne et sensibilité de la méthode.

En utilisant, comme nous l'indiquons ci-dessus, *Staphylococcus aureus*, on peut déceler, au moins :

- 0,02 à 0,04 μg d'érythromycine par ml ;
- 0,001 à 0,05 μg d'auréomycine par ml ;
- 0,02 à 0,1 μg de tétracycline par ml ;
- 0,05 à 0,1 μg de terramycine par ml ;
- 0,1 μg de streptomycine par ml ;
- 0,05 à 0,1 μg de mélange chloramphénicol-nitrofuraxone par ml ;
- moins de 0,005 U.I. de pénicilline par ml.

(Cliché C. R. Acad. Agric.)

Fig. 7. — Influence de l'auréomycine sur la croissance du *Staphylococcus aureus*.

Courbe 1 : croissance normale, sans antibiotique.

Courbe 2 : croissance en présence de 0,02 $\mu\text{g/ml}$.

Courbe 3 : croissance en présence de 0,01 $\mu\text{g/ml}$.

Courbe 4 : croissance en présence de 0,005 $\mu\text{g/ml}$.

Courbe 6 : croissance en présence de 0,002 $\mu\text{g/ml}$.

— En ordonnées : graduation du biophotomètre de Bonet-Maury.

— En abscisses : le temps en heures.

Comme toujours, c'est avec la streptomycine que l'on obtient les résultats les moins remarquables. Mais on reste toujours dans une zone de sensibilité bien plus fine qu'avec la méthode de diffusion en gélose (voir fig. 4 par rapport à la fig. 6, en ce qui concerne la pénicilline).

Enfin, la méthode que nous présentons n'est pas liée à une espèce microbienne, mais, au contraire, d'un emploi général. C'est ainsi que, depuis nos premiers essais, nous l'avons adaptée à la

Fig. 8. — Influence de streptomycine sur la croissance du *Staphylocoque doré*.

Courbe 1 : croissance normale sans antibiotique.

Courbe 2 : croissance en présence de 2 $\mu\text{g/ml}$.

Courbe 3 : croissance en présence de 1 $\mu\text{g/ml}$.

Courbe 4 : croissance en présence de 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Courbe 5 : croissance en présence de 0,1 $\mu\text{g/ml}$.

Courbe 6 : échantillon de lait renfermant de la streptomycine et dont le taux doit être estimé à 1,5 $\mu\text{g/ml}$, par comparaison avec les courbes-test 2 et 3.

— En ordonnées : graduation du biophotomètre de Bonet-Maury ;

— En abscisses : le temps en heures.

culture d'une espèce thermophile, *Bacillus stearothermophilus* (1) très sensible à certains antimicrobiens et préconisée pour la recherche de la pénicilline par GALESLOOT et HASSING [7].

Quelques modifications doivent être apportées au protocole précédent :

— il faut faire les cultures à 55° C. Le biophotomètre Bonet-Maury ne permettant d'obtenir par réglage direct que 45° C, un simple calorifugeage de l'appareil, en évitant les déperditions de chaleur, suffit pour réaliser la température requise.

— cette fois, *Bacillus stearothermophilus* pousse fort mal en lactosérum pur ; il est nécessaire d'y ajouter un peu de bouillon de viande peptoné, de façon à obtenir une culture immédiate et intense. Divers tâtonnements nous ont amenés à choisir un mélange à parties égales : 3 ml de bouillon de viande pour 3 ml de lactosérum dans chaque cuve du biophotomètre.

— enfin, à pH acide, certains constituants azotés du lactosérum flocculent à 55° C, et le trouble qu'ils créeraient ainsi serait enregistré comme croissance cellulaire par l'appareil. Il faut donc l'empêcher, en se débarrassant au préalable des constituants précipitables : le lactosérum des échantillons de lait à analyser et du témoin sont alors, aussitôt après récolte, chauffés à 65-70° C, avant filtration sur bougie.

Dans ces conditions, on constate que la lecture des résultats est encore plus précoce qu'avec *Staphylococcus aureus* : la divergence des courbes dont la croissance est ralentie par rapport à l'échantillon normal est déjà nette au bout d'une heure et, en tout cas, très grande au bout d'une heure trente.

On peut, par ailleurs, déceler selon les échantillons :

— de 0,001 à 0,005 μg d'érythromycine par ml ;
— de 0,050 à 0,100 μg d'auréomycine par ml ;
— 0,003 μg de tétracycline par ml ;
— de 0,015 à 0,050 μg de terramycine par ml ;
— de 0,100 à 0,500 μg de streptomycine par ml ;
— de 0,100 à 0,200 μg de chloramphenicol par ml ;
— de 0,00002 à 0,00005 U.I. de pénicilline par ml, soit moins de 0,05 U.I. par litre de lait. Comme il a fallu diluer de moitié le lactosérum, les concentrations trouvées devront être doublées pour les exprimer par rapport au « petit-lait » ou au lait de départ.

(1) Nous remercions infiniment M. Auclair, du Laboratoire de Microbiologie et de Technologie des produits animaux de l'I.N.R.A., d'avoir voulu nous adresser une souche de ce bacille.

Bacillus stearothermophilus est donc nettement plus sensible que *Staphylococcus aureus* à quatre antibiotiques : la pénicilline, la terramycine, la tétracycline, l'érythromycine ; il s'avère de sensibilité analogue pour la streptomycine et le chloramphénicol ; il reste de moindre valeur pour l'auréomycine.

Il sera toujours possible de trouver des souches bactériennes encore meilleures qui permettront de déceler des quantités encore moindres d'antibiotiques. La généralité d'emploi de la biophotométrie à cet égard n'est pas son moindre intérêt.

CONCLUSIONS

En utilisant comme base du milieu de culture le lactosérum même du lait à examiner, on peut adapter facilement le biophotomètre de Bonet-Maury à la recherche et à l'appréciation du taux d'antibiotique dans un lait. On pourra tout aussi bien l'appliquer en fromagerie, où l'on dispose du lactosérum d'une fabrication accidentée (fin du moulage ou du pressage) ou même suspecte (en cours d'opération).

Grâce à l'emploi de courbes de cinétique de développement microbien, on arrive à une grande rapidité de réponse et à une sensibilité remarquable.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. AUCLAIR. *Le Lait*, 1951, **31**, 121.
- [2] Difco Manual, 1 vol. Difco Labo. éd., Détroit, 9^e édition, 337.
- [3] P. DOPFER. *C. R. Ac. Agr.*, 1956, **42**, 519. — *Le lait*, 1960, **40**, 15.
- [5] T. GALESLOOT. *Neth. Milk Dairy J.*, 1962, **16**, 63.
- [6] T. GALESLOOT et H. LABOTS. *Neth. Milk Dairy J.*, 1959, **13**, 16 et 155.
- [7] T. GALESLOOT et F. HASSING. *Ned. Zuiveltijd.*, 1962, **16**, 89.
- [8] J. IGARASHI, R. GARGHMAN, F. NELSON et P. HARTMAN. *J. Dairy Sc.*, 1960, **43**, 841.
- [9] J. JACQUET. *Rev. Path. Gén.*, 1952, **52**, 557.
- [10] J. JACQUET, *Rec. Méd. Vét.*, 1953, **129**, 803.
- [11] J. JACQUET et F. CHARTON. *C. R. Ac. Agric.*, 1963, **49**, 373.
- [12] J. JACQUET et M^{me} L. STEEG. *C. R. Ac. Agric.*, 1952, **38**, 609.
- [13] J. JACQUET et M^{me} L. STEEG. *Ann. Falsif. et Fraudes*, 1953, **46**, 5.
- [14] J. JACQUET, J. DELACROIX et H. GONDOUIN. *C. R. Ac. Agric.*, 1951, **36**, 189.
- [15] J. JACQUET, J. DELACROIX, G. LETOURNEUR et M^{me} O. VILLETTE. *C. R. Ac. Agric.*, 1959, **45**, 849.
- [16] F. KOSIKOWSKI. *J. of Milk and Food Techn.*, 1960, **23**, 285.
- [17] F. KOSIKOWSKI et G. MOCQUOT. *C. R. XIV^e Congr. Intern. Lait.*, 1956, **3**, 203.
- [18] P. LEMAITRE. *C. R. Ac. Agric.*, 1963, **49**, 653.

- [19] M. LEMOIGNE, A. SANCHEZ et H. GIRARD. *C. R. Ac. Agric.*, 1952, **38**, 606.
- [20] G. MOCQUOT, R. CHEVALIER, R. BARNIER, J. AUCLAIR et C. ALAIS. *C. R. Ac. Agric.*, 1949, **35**, 30.
- [21] W. MOHR et K. KOENEN. *Die Molkerei Zeit.*, 1950, **71**, 1035.
- [22] P. MOREL. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 1962.
- [23] — *Le Lait*, 1962, **42**, 593.
- [24] C. NEAL et M. CALBERT. *J. Dairy Sc.*, 1955, **38**, 629.
- [25] J. PIEN, J. LIGNAC et P. CLAUDE. *Ann. Falsif. et Fraudes*, 1953, **46**, 258.
- [26] A. SANCHEZ et P. LAMENSANS. *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74**, 142.
- [27] G. SILVERMAN et F. KOSIKOWSKY. *J. Milk and Food Techn.*, 1952, **15**, 20.

LA POLLUTION RADIOACTIVE DU LAIT CONSOMMÉ DANS L'AGGLOMÉRATION PARISIENNE

par

C. MADELMONT et G. MICHON

Les explosions aériennes des armes nucléaires libèrent dans la stratosphère et dans l'atmosphère des produits de fission qui donnent lieu, à plus ou moins longue échéance, à des retombées radioactives terrestres. Celles-ci contaminent le sol, les plantes, les animaux et l'homme par l'intermédiaire de la chaîne alimentaire.

Cette contamination se retrouve en particulier dans le lait. Principal vecteur alimentaire du calcium dans l'alimentation européenne, il est important pour des questions d'ordre sanitaire d'en connaître sa teneur en ^{90}Sr et ^{137}Cs pour les éléments à vie longue et en ^{131}I et ^{89}Sr pour les éléments à vie courte et moyenne.

Nous avons cherché à obtenir quelques informations sur la teneur en ces divers radionuclides du lait distribué dans l'agglomération parisienne. La présente étude porte sur les années 1961 et 1962.

Prélèvements.

Les prélèvements ont été effectués par les soins du Laboratoire du lait du Service Vétérinaire Sanitaire de Paris et du département de la Seine (1) à la faveur d'autres prélèvements en vue de l'ins-

(1) Nous remercions très vivement MM. Basille et Hautefort qui ont assuré les prélèvements de lait, ainsi que Mme Augustin et M. Artaud qui ont prêté leur concours technique à la réalisation des dosages.