Les streptocoques D dans le lait cru réfrigéré

I. PRESENCE

par

G. WAES

Station Laitière de l'Etat, Melle (Belgique)

I. — INTRODUCTION

Des recherches ont été entreprises afin de déterminer le nombre de streptocoques D présents dans le lait cru réfrigéré. Les coliformes et les streptocoques D ayant, dans le lait cru, à peu près la même signification, les nombres des uns et des autres ont été comparés. On peut aussi arriver à une appréciation plus précise de l'importance des streptocoques D en les comparant avec d'autres indicateurs du degré d'hygiène présidant à la production du lait, par exemple avec le nombre de germes et avec le nombre de germes psychrotrophes.

II. — BIBLIOGRAPHIE

Parmi les streptocoques D on classe *S. faecalis* et ses variétés, *S. faecium* et sa variété *S. durans*, *S. bovis* et *S. equinus*. Certains auteurs entendent par streptocoques D, les entérocoques, mais alors au sens le plus large. Au sens restreint du terme, les entérocoques comprennent *S. faecalis* et ses variétés, *S. faecium* et sa variété *S. durans*. On trouvera plus d'informations à ce sujet chez Hartman et al. (1966).

On n'a pas encore entrepris jusqu'à présent l'étude systématique, à l'aide d'un milieu nutritif sélectif, du nombre de streptocoques D du lait cru. Il existe bien quelques publications sur les « entérocoques » du lait cru, mais elles ne précisent généralement pas ce qu'on y entend par ce terme. White et Sherman (1944) ont analysé 192 échantillons de lait cru et ont découvert que les entérocoques, au sens restreint, y constituaient 0,4 p. 100 de la flore totale. Des échantillons de lait à nombre de germes élevé contenaient un pourcentage moins élevé d'entérocoques. Higginbottom (1962) a examiné 14 échantillons prélevés à la ferme avant et après l'introduction de

la réfrigération. Le nombre moyen de germes et la teneur en entérocoques du lait refroidi à l'eau étaient respectivement de 10 000 et de 30 au ml. Ces nombres sont tombés à respectivement 8 700 bactéries et 10 entérocoques au ml pour le lait réfrigéré. Cet auteur pense que les entérocoques meurent dans le lait cru conservé à 5° C.

Saraswat (1963) a étudié 330 échantillons de lait cru « grade A » à nombre de germes moyen $\leq 100\,000$ au ml. La teneur moyenne en entérocoques au sens restreint était de 200 au ml et représentait environ 0,2 p. 100 de la flore totale. Dans 26,1 p. 100 des échantillons, la teneur en entérocoques était supérieure à 100 au ml. Le même auteur (1963) a également examiné 120 échantillons de lait cru « manufacturing grade ». Le nombre moyen de germes et la teneur moyenne en entérocoques au sens restreint s'élevaient respectivement à 2 000 000 et 5 600 au ml. Hashimoto (1961) a déterminé le nombre d'entérocoques de 50 échantillons de lait cru et en a trouvé de 0,2 à 16 000 au ml, la teneur moyenne étant de 908. Jicinska et Pesek (1967) ont examiné un nombre non précisé d'échantillons de lait cru prélevés de camions-citernes et ont relevé une nette corrélation entre le nombre d'entérocoques et la température du lait au moment du prélèvement de l'échantillon. La teneur moyenne était de 11 000 au ml en janvier et s'élevait à 50 000 en août.

III. — MATERIAUX ET METHODES

Les recherches effectuées pendant la période d'été ont porté sur 167 échantillons de lait réfrigéré provenant de 110 fermes. 127 échantillons provenant de 102 exploitations ont été examinés pendant la période d'hiver. La plupart des échantillons ont été prélevés après quatre traites. La température du lait réfrigéré s'élevait en moyenne à 4,4° C.

Nombre de germes

Le milieu nutritif utilisé était le Plate Count Agar + 1 p. 100 de lait stérilisé. Les plaques étaient incubées pendant 3 j par 30° C $\pm$ 1° C.

Streptocoques D

Le milieu était le BBL Streptosel Agar + 3 μ g de sulfate de kanamycine par ml (Waes, 1972). Les plaques étaient incubées pendant 2 j par 44° C $\pm$ 0,1° C. 1 ml de lait était réparti sur deux plaques lors de l'ensemencement.

Teneur en coliformes

Le milieu était le Violet Red Bile Agar. Une deuxième couche mince, était coulée par dessus la première après solidification de celle-ci. L'incubation par 30° C durait 20 h. Seules les colonies typiques étaient dénombrées.

Nombre de germes psychrotrophes

Le milieu nutritif était le Plate Count Agar. Les plaques étaient incubées 10 j par $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

IV. — RESULTATS

4.1. Nombre de streptocoques D et de coliformes

Streptocoques D

Le tableau 1 donne un aperçu du nombre de streptocoques D du lait réfrigéré. Le tableau donne entre parenthèses le pourcentage d'échantillons par classe de nombre de germes, qui se situent dans une classe déterminée de streptocoques D.

Le nombre de streptocoques D est plus petit pendant la période d'hiver que pendant la période d'été. C'est ainsi que le nombre d'échantillons de lait à faible teneur (≤ 100) est plus élevé en hiver (23,6 p. 100) qu'en été (8,5 p. 100). Pendant la période d'hiver, respectivement 5,9 p. 100 et 11,1 p. 100 des échantillons à nombre de germes de $> 200\,000$ et $\leq 500\,000$ et de $> 500\,000$ et $\leq 1\,000\,000$ ont un nombre de streptocoques D ≤ 100 au ml, contre 0 p. 100 pendant la période d'été. Pendant cette dernière période, le pourcentage d'échantillons à nombre de streptocoques D $> 10\,000$ au ml des échantillons de lait à nombre de germes supérieur à 100 000 augmente à mesure que le nombre de germes est plus élevé. Ceci n'est pas le cas pour la période d'hiver.

Pour les 291 échantillons de lait de l'année — 164 pour la période d'été et 127 pour la période d'hiver —, on a calculé le nombre moyen de germes et de streptocoques D. Les nombres moyens de germes pour l'année, pour la période d'été et pour la période d'hiver s'élevaient respectivement à 251 051, 281 183 et 212 378 au ml. Il découle de ceci qu'il faudra faire encore un sérieux effort pour améliorer la qualité du lait réfrigéré. Les nombres moyens des streptocoques D étaient respectivement de 10 050, 12 232 et 7 250. Pour l'année, 4 p. 100 de la flore étaient composés de streptocoques D. Ce pourcentage était de 4,4 pour la période d'été contre 3,4 pour la période d'hiver.

Si l'on considère uniquement des échantillons à nombre de germes $< 100\,000$ au ml, le nombre moyen de streptocoques D ne représente, pour l'année, que 2 p. 100 de la flore totale. Le nombre de germes des échantillons de lait a donc une influence sur le pourcentage de streptocoques D de la flore totale.

Coliformes

Le tableau 2 donne un aperçu de la teneur en coliformes du lait cru réfrigéré. On y retrouve la même distribution en classes que dans le tableau 1 en ce qui concerne le nombre de germes et la teneur en coliformes. Le pourcentage d'échantillons par classe de

TABLEAU 1. — Teneurs en streptocoques D dans le lait réfrigéré

Nombre de germes	Streptocoques D											
	0 ≤ 100			> 100 ≤ 1 000			> 1 000 ≤ 10 000			> 10 000		
	E	H	A	E	H	A	E	H	A	E	H	A
≤ 0 25 000	9 (36,0 %)*	11 (55,0 %)	20 (44,5 %)	12 (48,0 %)	9 (45,0 %)	21 (46,7 %)	4 (16,0 %)	0	4 (8,8 %)	0	0	0
≤ 25 000 50 000	1 (6,2 %)	3 (16,7 %)	4 (11,7 %)	10 (62,5 %)	11 (61,1 %)	21 (61,8 %)	5 (31,3 %)	4 (22,2 %)	9 (26,5 %)	0	0	0
≤ 50 000 100 000	3 (14,3 %)	7 (26,9 %)	10 (21,3 %)	8 (38,1 %)	10 (38,5 %)	18 (38,3 %)	10 (47,6 %)	8 (30,8 %)	18 (38,3 %)	0	1 (3,8 %)	1 (2,1 %)
≤ 100 000 200 000	1 (3,2 %)	6 (21,4 %)	7 (11,7 %)	14 (43,7 %)	8 (28,6 %)	22 (36,7 %)	12 (37,5 %)	6 (21,4 %)	18 (30,0 %)	5 (15,6 %)	8 (28,6 %)	13 (21,6 %)
≤ 200 000 500 000	0	1 (5,9 %)	1 (2,0 %)	8 (23,5 %)	8 (47,0 %)	16 (31,4 %)	18 (53,0 %)	5 (29,4 %)	23 (45,1 %)	8 (23,5 %)	3 (17,7 %)	11 (21,5 %)
≤ 500 000 1 000 000	0	2 (11,1 %)	2 (3,6 %)	8 (21,7 %)	7 (38,9 %)	15 (27,3 %)	13 (35,1 %)	4 (22,2 %)	17 (30,9 %)	16 (43,2 %)	5 (27,8 %)	21 (38,1 %)
Nombre	14 (8,5 %)	3 (23,6 %)	44 (15,0 %)	60 (36,4 %)	53 (41,7 %)	113 (38,7 %)	62 (37,6 %)	27 (21,3 %)	89 (30,5 %)	29 (17,5 %)	17 (13,4 %)	46 (15,8 %)

E : été

H : hiver

A : année

* : pourcentage d'échantillons tombant, par classe de nombre de germes, dans une classe déterminée de streptocoques D.

TABLEAU 2. — Teneur en coliformes du lait réfrigéré

Nombre de germes	Teneur en coliformes											
	0 ≤ 100			> 100 ≤ 1 000			> 1 000 ≤ 10 000			> 10 000		
	E	H	A	E	H	A	E	H	A	E	H	A
≤ 0	17	9	26	6	9	15	2	2	4	0	0	0
≤ 25 000	(68,0 %)*	(45,0 %)	(57,8 %)	(24,0 %)	(45,0 %)	(33,2 %)	(8,0 %)	(10,0 %)	(8,9 %)			
> 25 000	8	9	17	5	6	11	3	3	6	0	0	0
> 50 000	(50,0 %)	(50,0 %)	(50,0 %)	(31,3 %)	(33,3 %)	(32,4 %)	(18,7 %)	(16,7 %)	(17,6 %)			
> 50 000	9	10	19	7	11	18	6	5	11	0	0	0
> 100 000	(40,9 %)	(38,5 %)	(39,6 %)	(31,8 %)	(42,3 %)	(37,5 %)	(27,3 %)	(19,2 %)	(22,9 %)			
> 100 000	4	5	9	14	8	22	11	11	22	4	4	8
> 200 000	(12,1 %)	(17,9 %)	(14,7 %)	(42,4 %)	(28,5 %)	(36,1 %)	(33,4 %)	(39,3 %)	(36,1 %)	(12,1 %)	(14,8 %)	(13,1 %)
> 200 000	5	5	10	10	6	16	15	5	20	4	1	5
> 500 000	(14,7 %)	(29,4 %)	(19,6 %)	(29,4 %)	(35,3 %)	(31,4 %)	(44,1 %)	(29,4 %)	(39,2 %)	(11,8 %)	(5,9 %)	(9,8 %)
> 500 000	2	2	4	11	4	15	15	9	24	9	3	12
> 1 000 000	(5,4 %)	(11,1 %)	(7,3 %)	(29,7 %)	(22,2 %)	(27,3 %)	(40,6 %)	(50,0 %)	(43,6 %)	(24,3 %)	(16,7 %)	(21,8 %)
Nombre	45	40	85	53	44	97	52	35	87	17	8	25
	(26,9 %)	(31,5 %)	(28,9 %)	(31,7 %)	(34,6 %)	(33,0 %)	(31,1 %)	(27,6 %)	(29,6 %)	(10,3 %)	(6,3 %)	(8,25 %)

E : été
H : hiver
A : année

* : pourcentage d'échantillons tombant, par classe de nombre de germes, dans une classe déterminée de teneur en coliformes.

nombre de germes tombant dans une certaine classe de coliformes y figure aussi entre parenthèses.

Des 45 échantillons à nombre de germes $\leq 25\,000$ au ml, quatre ont une teneur en coliformes $> 1\,000$.

En moyenne 1,5 p. 100 de la flore était composé de coliformes, aussi bien pendant la période d'été et la période d'hiver que pour l'ensemble de l'année. Si l'on ne considère que les échantillons à nombre de germes $< 100\,000$ au ml, la teneur moyenne en coliformes représente également 1,5 p. 100 de la flore totale.

Streptocoques D et coliformes

Si l'on compare les données des tableaux 1 et 2, on remarque que pour pratiquement toutes les classes de nombre de germes le nombre d'échantillons à faible teneur en coliformes (≤ 100) est supérieur, voire de beaucoup supérieur au nombre d'échantillons à faible teneur en streptocoques D (≤ 100). D'autre part, le nombre d'échantillons à nombre élevé de streptocoques ($> 10\,000$) était plus grand pour chaque classe de nombre de germes que le nombre d'échantillons à forte teneur en coliformes ($> 10\,000$). Cette tendance était un peu plus marquée en été qu'en hiver.

4.2. Corrélations entre le nombre de streptocoques D, le nombre de germes, la teneur en coliformes et le nombre de germes psychrotrophes

Les chiffres reproduisant les nombres de streptocoques D, de germes totaux, de coliformes et de germes psychrotrophes ont été utilisés pour calculer un certain nombre de coefficients de corrélation. Les nombres ont préalablement été convertis en logarithmes. Un intervalle de confiance a été indiqué pour deux rapports très significatifs relatifs à l'année entière. Les méthodes statistiques appliquées étaient celles décrites par Snedecor et Cochran (1967).

Le tableau 3 reproduit les résultats des coefficients de corrélation obtenus pour l'été, pour l'hiver et pour l'année.

On a vérifié par la méthode du χ^2 calculé si les coefficients de corrélation des périodes d'hiver et d'été appartiennent au même univers. Le tableau indique les valeurs χ^2 calculées et les valeurs P correspondantes. La différence est significative pour des valeurs P inférieures à 0,05. Ceci est certainement le cas pour la corrélation Streptocoques D - teneur en coliformes. La corrélation streptocoques D - nombre de germes constituant un cas limite, on admet qu'il n'y a pas de différence significative. Quand les coefficients de corrélation pour l'été et pour l'hiver ne différaient pas significativement entre eux, on en calculait un pour toute l'année selon Snedecor et Cochran (1967). Pour les coefficients de corrélation très significatifs obtenus pour l'année entre streptocoques D et nombre de germes et entre nombre de germes et teneur en coliformes, on a

TABLEAU 3. — Lait réfrigéré

Coefficients de corrélation entre les nombres de streptocoques D, de germes totaux, de coliformes et de germes psychrotrophes

	Eté		Hiver		Année			
	Nombre de paires	r	Nombre de paires	r	Nombre de paires	r	χ^2	P
Streptocoques D - nombre de germes	165	0,593**	127	0,416**	292	0,522**	4,045	0,046
Streptocoques D - teneur en coliformes	164	0,480**	127	0,222*	291		6,179	0,014
Streptocoques D - nombre de germes psychrotrophes	68	0,308*	127	0,192*	195	0,233**	0,666	0,432
Nombre de germes - teneur en coliformes	166	0,530**	127	0,397**	293	0,476**	2,035	0,163
Nombre de germes - nombre de germes psychrotrophes	68	0,840**	127	0,782**	195	0,803**	1,247	0,270
Teneur en coliformes - nombre de germes psychrotrophes	68	0,550**	127	0,449**	195	0,485**	0,766	0,400

** : très significatif.

* : significatif.

déterminé l'intervalle de confiance avec une certitude de 99 p. 100. Ces intervalles étaient respectivement $0,403 \leq r \leq 0,624$ et $0,351 \leq r \leq 0,586$. Les deux corrélations sont très proches l'une de l'autre.

Hartley et *al.* (1968) ont trouvé des corrélations positives de 0,57 entre le nombre de germes et la teneur en coliformes et de 0,62 entre le nombre de germes et la teneur en entérocoques au sens restreint. Tatini et Olson (1965) ont obtenu des coefficients de corrélation de 0,56 entre le nombre de germes et le nombre de germes psychrotrophes et de 0,48 entre le nombre de germes et la teneur en coliformes.

V. — COMMENTAIRES ET CONCLUSION

Pour l'année, le nombre de streptocoques D des échantillons de lait réfrigéré examinés était ≤ 100 dans 15 p. 100, > 100 et $\leq 1\,000$ dans 38,7 p. 100, $> 1\,000$ et $\leq 10\,000$ dans 30,5 p. 100 et $> 10\,000$ au ml dans 15,8 p. 100 des échantillons.

Les échantillons d'un lait de bonne qualité bactériologique (nombre de germes $\leq 100\,000$ au ml), avaient des nombres de streptocoques D ≤ 100 dans 27 p. 100, > 100 et $\leq 1\,000$ dans 47,6 p. 100, $> 1\,000$ et $\leq 10\,000$ dans 24,6 p. 100 et $> 10\,000$ au ml dans 0,8 p. 100 des cas.

En moyenne 4 p. 100 de la flore étaient composés de streptocoques D. Ce pourcentage était de 4,4 pendant la période d'été et de 3,4 pendant la période d'hiver. Si l'on considère uniquement des échantillons de lait à $\leq 100\,000$ germes au ml, le nombre de streptocoques D ne représente que 2 p. 100 de cette population. La flore contenait en moyenne 1,5 p. 100 de coliformes, ceci indépendamment de la saison ou du nombre de germes du lait. Ces résultats révèlent que les streptocoques D et les coliformes ne constituent qu'une faible partie de la flore.

Des coefficients de corrélation très significatifs ont été relevés pour l'année entre le nombre de streptocoques D et le nombre de germes (0,522) et le nombre de streptocoques D et le nombre de germes psychrotrophes (0,232). Pour la corrélation streptocoques D - coliformes on a trouvé un coefficient très significatif pour l'été, mais non pour l'hiver. Ces corrélations ne sont pas élevées.

On a aussi pu démontrer que les corrélations entre streptocoques D et nombre de germes (0,522) et entre le nombre de germes et la teneur en coliformes (0,476) étaient très proches les unes des autres.

La question se pose de savoir à quelle teneur en streptocoques D il faut viser dans le cas du lait cru réfrigéré. On peut poser qu'aucune raison d'ordre technologique n'exige la présence de streptocoques D dans le lait cru. Le nombre doit, en outre, rester limité parce qu'on présume que ces streptocoques proviennent directement

ou indirectement d'une contamination fécale et peuvent éventuellement jouer un rôle dans les intoxications alimentaires (Waes 1973). Pour avancer un nombre, il faut aussi tenir compte de la situation réelle. Ce chiffre peut être abaissé à mesure que la qualité bactériologique du lait s'améliore. Partant des résultats obtenus quant à la présence de streptocoques D dans le lait cru réfrigéré, une teneur de $< 5\,000$ au ml nous semble réalisable sans plus. De fait, sur 126 échantillons de lait à nombre de germes $\leq 100\,000$, seulement 4 avaient un nombre de streptocoques D supérieur à 5 000 au ml.

Résumé

Des recherches ont été faites pendant l'été, l'hiver et pour toute l'année sur la teneur en streptocoques D de 294 échantillons de lait cru réfrigéré. Les nombres de streptocoques D ont été comparés avec la teneur en coliformes. De plus, on a calculé un certain nombre de corrélations entre les nombres de germes, de coliformes, de streptocoques D et de germes psychrotrophes.

Pour l'année, le nombre de streptocoques D des échantillons de lait réfrigéré examinés a été ≤ 100 dans 15 p. 100, > 100 et $\leq 1\,000$ dans 38,7 p. 100, $> 1\,000$ et $\leq 10\,000$ dans 30,5 p. 100 et $> 10\,000$ au ml dans 15,8 p. 100 des échantillons.

Pour l'année, la flore contenait 4 p. 100 de streptocoques D. Ce pourcentage était de 4,4 pour la période d'été et de 3,4 pour la période d'hiver. La proportion de coliformes dans la flore était d'en moyenne 1,5 p. 100 aussi bien pendant la période d'été et pendant la période d'hiver que pour toute l'année.

Entre les streptocoques D et le nombre de germes et entre le nombre de germes et la teneur en coliformes on a trouvé des corrélations très significatives, de respectivement 0,522 et 0,476.

Un nombre de $< 5\,000$ streptocoques D au ml semble réalisable sans plus dans un lait cru réfrigéré de bonne qualité bactériologique ($< 100\,000$ au ml).

Summary

Investigations were carried out in the summer, in the winter and over the year on D streptococci in 294 deep-cooled raw-milk samples. The numbers of D streptococci were compared with the coli content. Furthermore a number of correlations were calculated between the bacterial count, coli content, D streptococci and psychrotrophic bacterial count.

Over the year 15 p. 100 of the examined deep-cooled milk samples had a D streptococci number of ≤ 100 , 38.7 p. 100 > 100 and $\leq 1\,000$, 30.5 p. 100 $> 1\,000$ and $\leq 10\,000$ and 15.8 p. $> 10\,000$ per ml.

Over the year 4 p. 100 of the flora consisted of *D streptococci*. In the summer period this was 4.4 p. 100 against 3.4 p. 100 in the winter. On an average 1.5 p. 100 of the flora consisted of *coli* and this was so in the summer period as well as in the winter period and over the whole year.

Between *D streptococci*-bacterial count and bacterial count - *coli* content very significant correlations were found of 0.522 and 0.476.

In deep-cooled raw milk of good bacterial quality (< 100,000 per ml) a *D streptococcal* count of < 5000 per ml seems to be perfectly realizable.

Bibliographie

- HARTLEY (J. C.), REINBOLD (G. W.), VEDAMUTHU (E. R) and CLARK (W. G.) (1968). — Bacterial test results of Grade A raw milk samples as a measure of farm production conditions. *J. Milk Fd Technol.*, 31, 338.
- HARTMAN (P. A.), REINBOLD (G. W.) and SARASWAT (D. S.) (1966). — Indicator organisms. A review. I. Taxonomy of the fecal streptococci. *Int. J. systematic Bact.*, 16, 197.
- HASHIMOTO (H.) (1961). — Hygienic studies on enterococcus group in milk, meat and their products, especially on significance as an indicator of pollution. *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, 3, 503.
- HIGGINBOTTOM (C.) (1962). — Bacteriological studies on raw milk before and after the adaption of bulk milk cooling on the farm. *XVI Int. Dairy Congress*, A, 426.
- JICINSKA (E.) und PESEK (M.) (1967). — Über das Vorkommen der Enterokokken in Roh- und Trockenmilch. *Milchwissenschaft*, 22, 694.
- SARASWAT (D. S.) (1963). — Detection and significance of enterococci in dairy products, dissertation. *Iowa State University of Science and Technology* (U.S.A.).
- SNEDECOR (G. W.) and COCHRAN (W. G.) (1967). — Statistical Methods. *The Iowa State College Press*. Ames. (U.S.A.).
- TATINI (S. R.) and OLSON (J. C.) (1965). — Interrelationships among bacteriological methods for examination of farm bulk tank milk supplies. *J. Dairy Sci.*, 48, 770.
- WAES (G.) (1972). — Studie van de *D streptococci* in rauwe melk. *Doctoraatstesis, Universiteit van Gent*.
- WAES (G.) (1973). — Les streptocoques *D* dans le lait cru réfrigéré. II. La détermination des streptocoques *D* dans le système, actuel et futur, de détermination de la qualité. *Le Lait* (sous presse).
- WHITE (J. C.) et SHERMAN (J. M.) (1944). Occurrence of enterococci in milk. *J. Bact.*, 48, 262.
-