

LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

J. PIEN et J. BAISSE. — Sur la numération directe des microbes du lait	705
J. ALQUIER et M ^{lle} SILVESTRE DE SACY. — Variations quantitatives et qualitatives de la production du lait chez la vache sous l'influence de la castration (<i>Fin</i>)	712
G. BELLE. — Recherches sur la croissance des mammifères. Ses relations avec la composition chimique du lait de la mère (<i>A suivre</i>)	725

Bibliographie analytique :

1 ^o Les Livres	738
---------------------------------	-----

2 ^o Journaux, Revues, Sociétés savantes	740
3 ^o Brevets	768

Bulletin bibliographique :

1 ^o Brevets	771
------------------------------	-----

Documents et informations :

Les belles installations en laiterie. VI	772
Le dixième anniversaire de la Ligue du Lait	781
La loi allemande	782
Quelques chiffres intéressants	798
Une formule de bouillie au lait sec dans la mythologie romaine	799
La troisième Semaine du lait à Kiel	779

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

SUR LA NUMÉRATION DIRECTE DES MICROBES DU LAIT

par

JEAN PIEN,

et

JACQUES BAISSE,

Ingénieur chimiste (I. C. R.),

Ingénieur chimiste (I. C. R.)

Docteur ès sciences,

de la

Directeur des laboratoires des

Société « Ofco ».

« Fermiers Réunis ».

La détermination de la richesse microbienne du lait est d'une importance capitale au point de vue hygiénique.

C'est évidemment le nombre de germes *vivants* qui présente le plus d'intérêt. Mais l'évaluation du nombre *total* des microbes (*vivants ou morts*) ne doit cependant pas être négligée ; car, d'une part, elle renseigne sur le nombre de germes qui vivent ou qui ont vécu dans le lait (c'est-à-dire qui ont sécrété des diastases ou des toxines avant leur mort), et d'autre part, parce que sur un lait cru non pasteurisé le nombre des germes vivants n'est pas très différent du nombre de germes totaux.

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

Seules, les méthodes de *culture sur plaques* (par numération des colonies dans tel ou tel milieu) permettent d'apprécier le nombre de germes vivants.

Seules, les méthodes de *numération directe* (sous le microscope) permettent d'apprécier le nombre de germes totaux (vivants et morts).

Pour les laits pasteurisés la méthode de culture sur plaques fournit le renseignement le plus précieux (microbes vivants), encore que la numération directe soit utile pour estimer, *a posteriori*, la valeur initiale de la « matière première » que l'on a pasteurisée.

Pour les laits crus, ou lors des contrôles à l'étable, la numération directe rend d'inappréciables services : en raison de sa *rapidité*, qui permet d'obtenir des renseignements presque instantanés, en raison aussi de la *grande précision* qu'elle peut atteindre (précision que ne peuvent lui envier les procédés de culture pour les germes vivants) et par ce fait aussi qu'elle échappe aux variations et aux incertitudes inhérentes aux procédés de culture, suivant les conditions du prélèvement (lait agité ou non, d'où amas de microbes disséminés ou non, produisant un nombre de colonies qui ne représente pas le nombre de germes), suivant les conditions de l'observation (température, durée) et suivant les conditions de milieu (qui favorisent ou entravent le développement de toute une catégorie de ferments. La comparaison du milieu « Standard Américain » et du milieu d'Orla-Jensen est particulièrement significative à cet égard).

Donc, quand le nombre de germes vivants est comparable à celui des germes totaux, la méthode de numération directe offre plus de garantie, de simplicité et de rapidité que la méthode des cultures.

Dans tous les autres cas, il est avantageux d'y avoir recours pour apprécier la richesse microbienne originelle du lait.

* * *

ETUDE DE LA NUMÉRATION DIRECTE.

I. *Du choix d'un mode d'examen.*

On serait tenté, en matière de numération directe des germes du lait, de faire appel aux hématimètres ou aux diverses cellules à épaisseur invariable.

En traitant le lait par la méthode d'Adam, en colorant la couche sous-jacente, on obtient en effet un liquide limpide qui se prêterait bien à la numération en milieux aqueux.

Mais l'épaisseur de ces cellules, si petite qu'elle soit, n'est pas négligeable.

Cet inconvénient n'est pas gênant quand on compte des globules

qui se déposent tous sur la lame et se trouvent ainsi situés dans un même plan. Il n'en va pas de même avec les microbes qui restent en grande partie en suspension dans le liquide en raison de leur légèreté et des mouvements browniens.

Si l'on s'adresse à une cellule de 0 mm. 5, il y a, entre lame et lamelle, une infinité de plans de mise au point possibles où l'on rencontre des germes.

Si, pour parer à cet inconvénient, on construit une cellule plus mince, on tombe dans de plus grandes difficultés : pour rassembler les germes entre lame et lamelle sur un seul plan de mise au point, il faudrait donner à l'écartement lame-lamelle une épaisseur de l'ordre de 10 microns (au lieu de 500, comme dans le cas précédent). Mais il s'ensuit que la numération deviendrait presque impossible. Avec un lait contenant 500.000 germes totaux par cm^3 , on aurait, dans une cellule de 0 mm. 5, 25.000 germes sur une surface totale explorable de 1 cm^2 . Comme le champ d'un objectif à immersion d'1/15 couvre une surface de l'ordre de 1/100 de mm^2 (ou 1/10.000 de cm^2), on aurait 2 germes 5 en moyenne dans le champ. Mais nous venons de dire que cette observation serait impossible en raison de la trop grande épaisseur de la cellule.

Avec la cellule hypothétique de 10 microns d'épaisseur (1/100 de mm.), le nombre de germes dans le champ de l'objectif sera 50 fois moindre, c'est-à-dire qu'il faut observer 20 champs différents en moyenne pour y découvrir un germe.

Cette difficulté est déjà presque inacceptable, bien que d'ordinaire, on répartisse la numération sur de très nombreux champs. Mais il faut se garder d'oublier d'abord qu'une cellule de 1/100 de millimètre d'épaisseur réglée avec certitude est irréalisable, ensuite que les erreurs dans la numération menée de cette façon seraient considérables et enfin, surtout, qu'on a quelquefois des laits 10 fois ou 20 fois moins chargés en germes que celui de l'exemple choisi et pour lesquels la méthode deviendrait absolument impraticable.

Il ne faut donc pas songer à s'adresser à des cellules du type des hématicimètres (même adaptées) pour dénombrer les germes totaux du lait.

Il faut rassembler sur un même plan tous les germes d'un volume de lait donné et, pour cela, *pratiquer la dessiccation d'une petite quantité de lait connue.*

II. Préparation du lait.

Certains auteurs ne font subir aucun traitement préalable au lait. Ils l'étaient, le séchent et le dégraissent au xylol avant de le colorer.

L'inconvénient de ce procédé est de provoquer la formation d'un lit de caséine très irrégulier au cours du séchage. Il en résulte

quelquefois un aspect de rocaïlle qui gêne l'examen et souvent sous ces irrégularités se dissimulent des germes qui peuvent échapper à la numération.

D'autres auteurs mettent la caséine en solution et dégraissent en traitant le lait par la méthode d'Adam. Ce procédé, qui échappe à la critique précédente, présente cependant d'autres graves inconvénients : il dilue le lait (on prélève en effet un sérum dilué 3 ou 4 fois), la dessiccation de la partie prélevée est très délicate, en raison de la présence de l'ammoniaque et de l'alcool dans la couche sous-jacente où l'on prélève ; ces substances, facilement volatiles, déterminent, même par un chauffage très prudent, des bulles qui laissent une trace et rendent la surface hétérogène.

En outre, les microbes qui sont entraînés et retenus dans la couche éthérée surnageante sont perdus pour l'examen et c'est là un inconvénient évidemment très grave.

Nous avons cherché à mettre au point une méthode susceptible d'échapper aux critiques précédentes.

Nous avons tout d'abord éliminé la seconde méthode (traitement au réactif d'Adam), qui comporte des inconvénients de principe irrémédiables (répartition des microbes dans les deux couches).

Le problème se réduisait donc pour nous à ceci : obtenir que dans la première méthode (dessiccation du lait, suivie d'un dégraissage) les craquelures et irrégularités d'épaisseur de la couche fussent éliminées.

Après de nombreux essais, nous nous sommes arrêtés à une technique simple, dont voici le principe : additionner le lait avant étallement et séchage d'une petite quantité de *chlorure de calcium*.

La très grande hygroscopicité de cette substance en fait un régulateur de dessiccation de premier ordre.

Au cours de la dessiccation, les parties qui auraient tendance à sécher trop vite (et à provoquer des craquelures) reprennent facilement de l'eau aux parties humides voisines, grâce au CaCl_2 présent sur toute la surface.

On obtient ainsi une dessiccation régulière de l'ensemble de la préparation.

Le CaCl_2 , qui joue le rôle de véhicule d'humidité, constitue donc un excellent « volant » de dessiccation.

Une fois le séchage achevé, on obtient un film transparent, très lisse, sans déchirures, ni opacités, ni irrégularités, semblable à une couche homogène de vernis cellulosique.

L'emploi du chlorure de calcium présente un autre avantage très appréciable : il rend la préparation très résistante et très adhérente. On peut sans danger faire des colorations différentielles, des Gram, sur la plaque ainsi préparée, alors que la chose est très

difficile sinon impossible par la méthode habituelle sans CaCl_2 , car la pellicule se décolle presque invariablement au cours des traitements.

Technique adoptée. — Voici la technique qui nous a donné les meilleurs résultats :

Dans un tube à essai, introduire 5 cm^3 du lait à examiner et 1 cm^3 d'une solution à 50% dans l'eau de chlorure de calcium cristallisé.

Le lait est donc ainsi dilué de 1/5.

Aussitôt ce mélange fait, on procède aux opérations d'étalement, dessiccation, coloration et de numération, comme il est indiqué ci-après.

III. Préparation de la lame.

Quel que soit le procédé adopté pour dégraisser et colorer, il faut d'abord réaliser la condition suivante : étaler un volume connu, sur une surface connue.

On adopte en général le 1/100 de cm^3 et le cm^2 .

On trouve (quoique assez difficilement) des pipettes de 1/100 de cm^3 bien construites.

Encore faut-il s'imposer patiemment de les vérifier ; et la chose est possible, puisque 1/100 de cm^3 d'eau pèse 10 milligrammes.

D'ailleurs, une précision de 5% est largement suffisante.

(Si l'on cherchait à augmenter la surface pour pouvoir augmenter aussi le volume prélevé, on rencontrerait des difficultés dans la réalisation d'un étalement homogène et cette cause d'erreur ne serait pas contrebalancée par l'avantage minime d'un prélèvement un peu plus important.)

L'étalement n'est pas très difficile à résoudre, si on a soin de tracer sur une lame un carré limité par des traits au diamant et distants de 1 cm. exactement.

La rigole formée par le diamant facilitera d'ailleurs l'étalement et limitera exactement la surface.

La pipette étant vidée au centre du carré, une pointe d'aiguille facilitera la répartition du liquide avec le minimum d'erreur.

La dessiccation (grâce à la présence du chlorure de calcium) se fait sans difficulté. Il suffit d'avoir une platine chauffante bien horizontale et de ne pas chauffer trop fort. La dessiccation est rapide et, comme nous l'avons dit, très régulière.

Après dessiccation, on lave à l'alcool à 90° (pendant 3 minutes) pour éliminer le chlorure de calcium.

On sèche à nouveau pour éliminer l'alcool, on dégraisse au xylol comme dans les procédés ordinaires (pendant 1 minute), on rince à l'éther pour éliminer le xylol, on sèche encore, puis on colore au

bleu de méthylène en utilisant une solution aqueuse à 0,2 %, que l'on fait agir pendant 20 à 30 secondes.

On rince avec de l'eau distillée et on sèche.

IV. Numération des germes.

La lame ainsi préparée présente par transparence l'aspect d'un film limpide, et très homogène. Elle ne comporte ni zones sombres, ni zones claires. Sa surface est très lisse.

On dépose une goutte d'huile de cèdre et on examine à l'immersion (avec condensateur et diaphragme ouvert).

Une précaution pratique très intéressante consiste à « jauger » le champ du microscope une fois pour toutes. En choisissant convenablement l'objectif, l'oculaire et le tirage du corps mobile du microscope (à l'aide d'un repère), on s'arrangera pour que le diamètre du champ soit de 120 microns (soit 0 mm. 120), par réglage à l'aide d'un micromètre objectif. De cette façon, si on parcourt le carré de 1 cm² d'un trait de diamant à l'autre (en déplaçant la platine à l'aide du chariot), on aura exploré la totalité d'une bande ayant la longueur du carré (1 cm.) et la largeur du champ (0 mm. 12), soit une surface totale de $1 \times 0,012 = 0 \text{ cm}^2 \text{ 012}$. Cette bande complète correspond à un volume de mélange initial de 0 cm³ 00012, puisque le cm² entier avait reçu 1/100 de cm³.

Comme le lait a été dilué de 1/5 avec le CaCl₂, le nombre de germes comptés dans cette bande correspondra aux germes de 1/10.000 de cm³ de lait pur.

Donc, pour N germes rencontrés dans une bande ainsi examinée d'un bord à l'autre du carré, le nombre total de germes du lait pur sera de 10.000 N au cm³.

Autrement dit, un germe rencontré dans cette bande correspondra à 10.000 germes dans un cm³ de lait.

Bien entendu, si, au lieu d'une seule bande, on examine deux bandes parallèles ou perpendiculaires, chaque microbe rencontré correspondra à 5.000 germes dans 1 cm³ de lait. Si, enfin, on additionne les germes rencontrés dans 5 bandes parallèles, le « facteur » se réduira à 2.000 ; autrement dit, un seul germe rencontré au cours de ces 5 explorations correspondra à 2.000 germes dans 1 cm³ de lait, ce qui constitue une précision largement suffisante pour un milieu ordinairement très chargé en germes.

Cette manière de procéder est infiniment préférable à celle qui consiste à examiner des champs différents et isolés, dont le repérage est difficile. La « lecture » d'une bande se fait très aisément, sans qu'on ait à craindre de compter deux fois les mêmes germes, surtout quand leur nombre est réduit.

Pour les laits très chargés, l'erreur absolue qui pourrait résulter

du double comptage de quelques germes ne se traduira pas par une erreur relative appréciable.

Ce découpage de la surface d'étalement en « tranches » parallèles élimine l'erreur qui pourrait résulter d'un manque d'homogénéité accidentel au séchage (condensation dans l'un des angles par exemple due à une platine chauffante inclinée).

Notons enfin que les bandes peuvent être comptées dans deux sens perpendiculaires, ce qui élimine encore l'erreur due à l'accumulation des germes sur un côté parallèle aux bandes et risquant d'être inexploré.

En pratique, on aura, dans la plupart des cas, un très bon résultat en explorant 2 bandes perpendiculaires et en multipliant par 5.000 le nombre total de germes comptés.

* * *

RÉSUMÉ

La technique la plus sûre et la plus simple pour la numération directe des germes totaux (vivants et morts) du lait nous paraît être la suivante :

1° 5 cm³ de lait sont additionnés de 1 cm³ d'une solution de CaCl² cristallisé à 50% dans l'eau.

2° On étale 1/100 de cm³ de ce mélange sur un carré de 1 cm. de côté tracé au diamant sur une lame de verre.

3° On sèche, lave à l'alcool à 90°, sèche à nouveau, dégraisse au xylol, rince à l'éther, sèche encore, colore au bleu de méthylène, rince à l'eau et sèche une dernière fois.

4° On examine à l'immersion, en ayant soin de jauger le champ pour qu'il ait 120 microns de diamètre (0 mm. 120).

5° On explore des bandes d'un trait de diamant à l'autre (c'est-à-dire de 1 cm. de long et de 120 microns de large).

1 germe rencontré dans cette bande correspond à 10.000 germes dans 1 cm³ de lait pur.

Avec deux bandes perpendiculaires, on multipliera le nombre total de microbes rencontrés par 5.000 (pour avoir le nombre de germes de 1 cm³ de lait pur) et on aura là, dans la majorité des cas, une précision largement suffisante.