

LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

E. ZAPATERO. — Le contrôle hygiénique du lait. Une méthode pratique et simple de colimétrie	689
L. BURUANA. — La recherche et le dosage de l'urine dans le lait	698
G. BARTHÉLEMI. — L'obturation des cruches, pots, bidons à lait	705
J. Y. PISSAREWSKY. — Contribution à l'étude du lait de bufflesse. Production, propriétés, composition et dérivés (<i>Fin</i>)	711
A. MASSOT et H. LESTRA. — Le dosage des chlorures dans les laits	723

Bibliographie analytique :

1 ^o Les livres	725
2 ^o Journaux, Revues, Sociétés savantes	735
3 ^o Brevets	783

Bulletin bibliographique :

1 ^o Journaux, Revues, Sociétés savantes	787
2 ^o Brevets	791

Documents et informations :

Répression des fraudes : « Lait faible en matière grasse ». « Appellation d'origine »	793
Le marché du beurre dans le monde en 1935	794
Le commerce du fromage dans le monde en 1935	795
Exportation danoise des beurres en 1935	797
Exportation des beurres de Suède en 1935	797
Production de la margarine aux Etats-Unis en 1935	797
Un centre de distribution et de vente de lait maternel	798
Création d'un Comité du lait dans divers départements	799
Traitement des eaux résiduaires de laiterie en Angleterre	799
La meilleure vache laitière. Relevé des déclarations de stocks de beurres	800
Ecole Supérieure d'Agriculture et de Viticulture d'Angers	800
Ecole Nationale d'Industrie laitière à Mamirolle	800

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

LE CONTROLE HYGIÉNIQUE DU LAIT

Une méthode pratique et simple de colimétrie

par EMILIO ZAPATERO

Département d'Hygiène et de Microbiologie de la Faculté de Médecine de Valladolid (Espagne)

Directeur : Prof. Dr Emilio ZAPATERO.

Le grand nombre de travaux parus ces dernières années sur la recherche et la détermination du groupe « Coli aérogènes » dans le lait, indique bien l'importance de la question. Dans le présent travail, nous n'allons pas nous occuper de l'étude de la signification

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

de la présence des bacilles qui constituent ledit groupe dans le lait, ni de l'importance pratique de la question dans le domaine de l'inspection sanitaire de cet aliment. Nous avons déjà traité tout cela dans d'autres publications (1).

Nous allons exposer ici uniquement la technique que nous avons suivie dans nos travaux, afin de la soumettre à l'examen et à la critique de ceux qui s'intéressent à ces questions. Si de la discussion sort une méthode qui soit adoptée par tous, afin que les résultats soient comparables et que l'on aboutisse à la solution du problème, nous nous considérerons comme satisfait.

Nous avons commencé nos déterminations colimétriques dans le lait en l'année 1930 et le point de départ de notre étude fut la technique proposée par les italiens NERI et SIMONETTI (*Ann. d'Ig.*, 1930, p. 345). Ces auteurs utilisent, comme presque tous, la fermentation du lactose comme base de la méthode. Nous nous sommes bientôt convaincu de la nécessité d'une méthode plus sélective afin de fonder le titre colimétrique du lait sur le colibacille de type *fécal* exclusivement.

Dans le dernier de nos travaux (récemment analysé dans cette Revue) nous avons exposé les raisons qui nous ont induit à penser de cette façon et à adopter la conception suivante du colibacille : *bacille court, aérobic facultative, peu mobile, sans capsule, extrémités arrondies, sans spores, ne prend pas le Gram, ne liquéfie pas la gélatine, fermente avec acide et gaz le lactose, avec acide et gaz tardifs la dulcité, ne fermente pas le saccharose, coagule le lait, vire le rouge neutre et le rouge de phénol, produit de l'indol dans les milieux peptonés, est négatif au Voges-Proskauer et positif au rouge de méthyle.*

Nous avons donc décidé de préparer un milieu à base de *dulcité*. En étudiant la bibliographie nous avons pu constater l'unanimité existant chez tous les auteurs sur la fermentation de la *dulcité* par le colibacille. Nous pourrions reproduire ici les opinions des divers auteurs américains, mais nous nous limitons à celle de l'un des auteurs qui ont le mieux étudié les propriétés fermentescibles du colibacille, nous voulons dire Besson. Cet auteur donne huit bases (BESSON : *Technique Microbiol.*, 1924, pages 752-29) pour l'identification du colibacille. En sixième lieu figure la suivante : « la fermentation constante de la *dulcité* avec production de gaz dans l'eau peptonée. »

Nous avons commencé nos recherches en comparant les résultats obtenus avec la méthode de NERI et SIMONETTI (lactose) et avec la

(1) E. ZAPATERO. Contribution à l'étude de la bactériologie du lait, *Valladolid*, 1932. — Le colibacille dans le lait du marché, *Rev. de San. e Hig. Pec.*, Madrid, novembre 1932. — Le contrôle hygiénique du lait par la colimétrie, *Bull. de l'Université de Santiago* (Espagne), 1935.

nôte (dulcite). Une difficulté se présenta : la dulcite est un « sucre » cher et ceci ne permet pas de l'employer dans une méthode qui prétend s'appliquer à la pratique quotidienne du contrôle sanitaire du lait. Il fallait donc trouver le moyen de travailler avec de très faibles quantités.

Après divers tâtonnements dans la détermination de la dose minima utilisable, en procédant comme le fit BESSON pour le glucose, nous avons trouvé qu'on pouvait travailler avec une concentration de *cinq milligrammes* par centimètre cube de milieu et qu'il suffisait de mettre dans chaque tube cette quantité. En conséquence, nous avons préparé notre milieu de la façon suivante :

	Grammes
Extrait de viande Liebig	10
Peptone	10
Chlorure de sodium	5

Dissoudre à chaud l'extrait de viande ; dissoudre à part et également à chaud la peptone et le chlorure de sodium. Mélanger les deux solutions et ajouter de l'eau pour compléter à un litre. Neutraliser simplement au carbonate de soude N/10, filtrer, ajouter 5 cm³ d'une solution à 1% de rouge de phénol dans le carbonate de soude N/10 et stériliser à l'autoclave.

Dans notre désir de rendre la méthode la plus simple possible, nous nous sommes borné à neutraliser en présence du papier de tournesol, et, bien qu'on ait en vérité simplifié au maximum les techniques d'ajustement du pH, la première est toujours la plus simple.

D'autre part, nous avons préparé une solution de dulcite dans l'eau distillée à raison de 5 milligrammes par centimètre cube et nous l'avons stérilisée. Il est plus commode de mettre la solution dans des ampoules d'un centimètre cube que l'on verse dans le milieu à analyser au moment de l'emploi.

Le milieu à analyser est réparti la veille de son emploi dans de petits tubes à hémolyse (nous avons utilisé ceux de 100 × 10 mm.) à raison d'un centimètre cube du bouillon au rouge de phénol et un autre (ou une ampoule) de la solution de dulcite. On mélange bien en faisant rouler les tubes entre les deux mains et on les porte à l'étuve à 37° jusqu'au lendemain où ils seront ensemencés. Le milieu doit être parfaitement limpide et teinté de rouge.

Au début, nous avons introduit dans les tubes, des cloches de fermentation, mais nous avons constaté que, avec la dulcite, le colibacille a coutume de donner les gaz tardivement (quelquefois, on ne les a pas avant 48 heures et plus), et comme nous cherchions une méthode rapide, puisque l'échantillon de lait doit être déterminé le plus vite possible dans la pratique laitière, nous avons décidé

de supprimer le petit tube de fermentation et de nous limiter uniquement aux renseignements fournis par le virage au jaune du rouge de phénol, ce qui, comme nous l'avons bien établi, est suffisant.

Une fois le milieu préparé dans la forme indiquée et les tubes retirés de l'étuve, on procède à l'ensemencement du lait. Celui-ci est dilué dans une solution saline physiologique stérile et les dilutions se préparent selon l'objet que l'on poursuit : si l'on veut vérifier la sensibilité de la méthode, on prépare des dilutions dont les titres soient aussi proches que possible. En ce qui concerne l'application à la pratique, il faut tenir compte que la dilution doit être plus grande s'il s'agit de lait cru que s'il s'agit de lait pasteurisé ou stassanisé. Nous détaillerons cela par la suite.

Pour la vérification de la sensibilité et de l'utilité de la méthode nous avons nous-mêmes procédé de la manière suivante :

Préparer dans une série de 11 tubes les dilutions de lait dans la forme exposée dans le tableau qui suit et ensemencer 1 cm³ de chaque dilution dans chaque tube de milieu.

Tube A : 0 cm³ 7 de solution saline + 0 cm³ 3 de lait = 1/10

Tube B : 0 cm³ 7 de solution saline + 0 cm³ 3 du tube A = 1/100

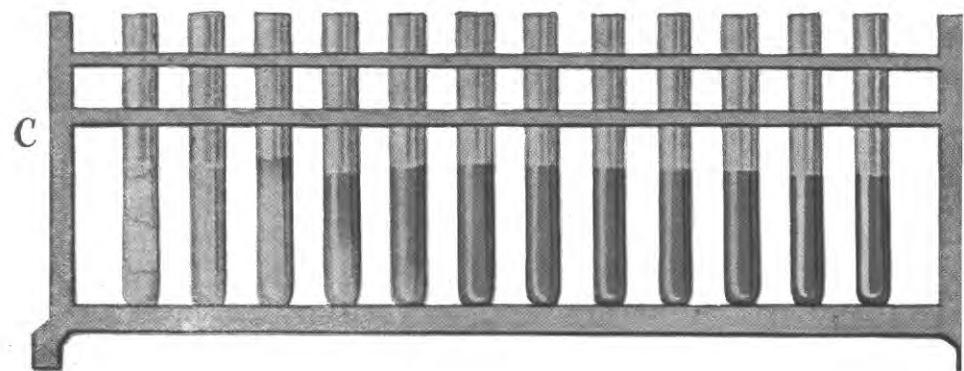
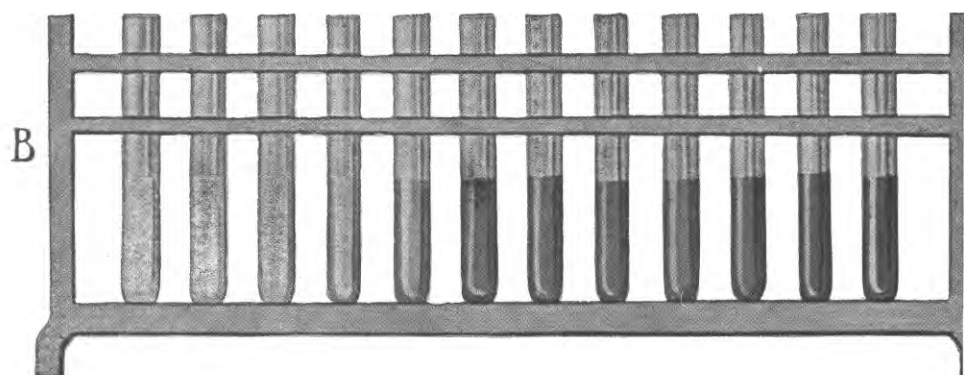
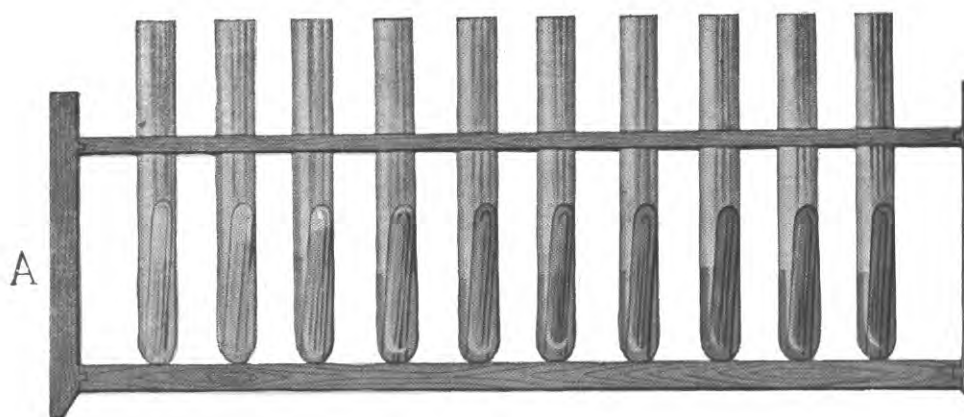
Tube C : 0 cm³ 7 de solution saline + 0 cm³ 3 du tube B = 1/1.000

En partant de ces trois dilutions on prépare la série :

		Quantité de lait cm ³
Tube 1 : 1 cm ³ du lait entier	1
Tube 2 : 1 cm ³ du tube A = 1/10	0,1
Tube 3 : 0 cm ³ 5 du tube A + 0,5 de sol. sal. = 1/20	0,05
Tube 4 : 0 cm ³ 2 du tube A + 0,8 de sol. sal. = 1/50	0,02
Tube 5 : 1 cm ³ du tube B = 1/100	0,01
Tube 6 : 0 cm ³ 5 du tube B + 0,5 de sol. sal. = 1/200	0,005
Tube 7 : 0 cm ³ 2 du tube B + 0,8 de sol. sal. = 1/500	0,002
Tube 8 : 1 cm ³ du tube C = 1/1000	0,001
Tube 9 : 0 cm ³ du tube C + 0,5 de sol. sal. = 1/2000	0,0005
Tube 10 : 0 cm ³ du tube C + 0,8 de sol. sal. = 1/5000	0,0002
Tube 11 : 0 cm ³ 1 du tube C + 0,9 de sol. sal. = 1/10000	0,0001

Si nécessaire, on peut allonger la série en préparant un tube D au 1/10.000^e et continuer. L'exactitude augmente si, à chacune de ces dilutions, on ensemence 2 tubes de milieu, et un résultat positif s'obtient quand le virage se présente dans les 2 tubes ensemencés avec la même quantité.

Le positif se décèle lorsque les tubes qui contiennent des colibacilles virent au jaune. Par conséquent le coli-titre de l'échantillon (quantité minima de lait qui accuse la présence du coli) nous est donné par le dernier tube qui présente le virage au jaune. Par la



dilution ensemencée nous calculons le nombre de *B. Coli* par centimètre cube de l'échantillon :

<i>B. Coli</i> par centimètre cube		<i>B. Coli</i> par centimètre cube	
Tube 1	1	Tube 7	500
Tube 2	10	Tube 8	1.000
Tube 3	20	Tube 9	2.000
Tube 4	50	Tube 10	5.000
Tube 5	100	Tube 11	10.000
Tube 6	200	Tube 12	témoin.

Il convient de mettre toujours un tube témoin pour nous assurer de la stérilité du milieu et de l'absence de virage.

Voici la marche que nous avons suivie pour vérifier notre méthode. Une fois les tubes ensemencés et portés à l'étuve à 37° pendant 24 heures, on procède à la lecture des résultats. Le colitite nous est donné par le dernier tube qui a viré.

La vérification s'est effectuée comme suit : parallèlement à chaque tube nous avons ensemencé une plaque d'Endo avec la même dilution et les colonies rouges obtenues ont été soumises aux essais suivants :

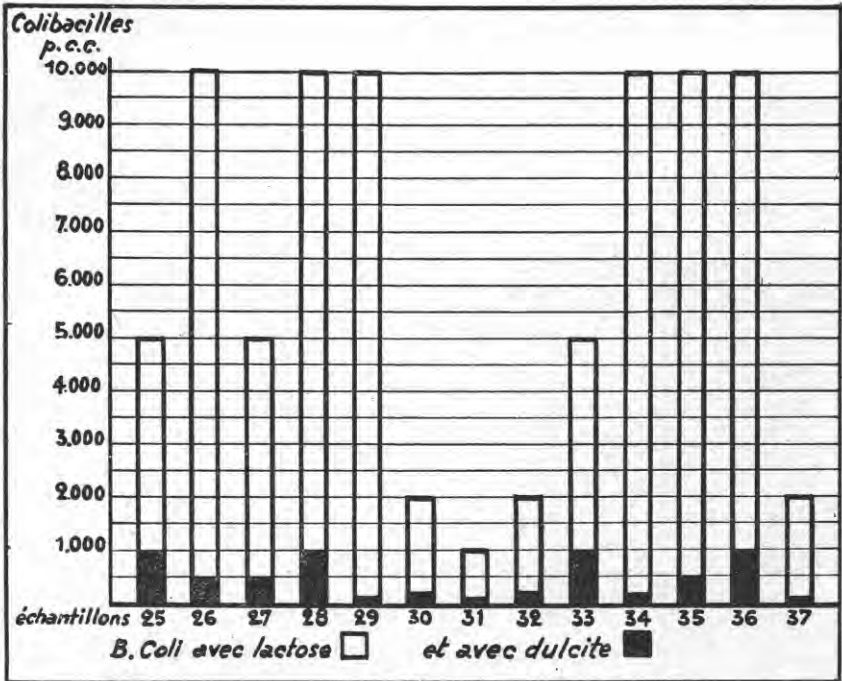
- 1° Examen microscopique : morphologie, mobilité et Gram.
- 2° Fermentation du lactose en milieux liquides (eau, peptone), avec tube de fermentation.
- 3° Fermentation de la dulcité dans les mêmes conditions.
- 4° Non-fermentation du saccharose.
- 5° Coagulation du lait.
- 6° Non-liquéfaction de la gélatine.
- 7° Réduction du rouge neutre.
- 8° Production d'indol dans l'eau peptonée.
- 9° Réaction de Voges-Proskauer négative.
- 10° Réaction du rouge de méthyle positive.

Nous avons pu voir que les colonies constituées par des germes qui répondent à toutes ces caractéristiques sont toujours présentes dans les tubes qui présentèrent le virage au jaune et n'ont jamais été obtenues dans ceux qui n'ont pas viré.

Nous devons avertir qu'en une certaine occasion certaines colonies rouges dans l'Endo étaient constituées par un germe qui ne fermentait pas la dulcité, mais qui fermentait le saccharose, avec Indol négatif : il ne s'agissait donc pas par conséquent du germe que nous cherchions.

Dans le tableau ci-après nous reproduisons, en A, un aspect de l'échantillon avant de le retirer du tube de fermentation, et en B et C deux aspects de la forme dans laquelle nous le réalisons couramment. Les derniers tubes des trois séries sont des témoins.

Nous avons comparé notre technique avec plusieurs des différentes méthodes pour la colimétrie dans le lait. Nous avons étudié les méthodes suivantes : Pegallac, Pancosm, Rotemberg, Kufferath, Simonds et Zavagli. Les résultats nous ont conduit à classer ces méthodes sous le rapport de leur sensibilité dans la forme que nous indiquerons ci-après. Auparavant il est intéressant de nous référer à la comparaison de notre milieu avec ceux qui utilisent le lactose.



Comme nous l'avions déjà supposé, les colititres obtenus avec le lactose sont plus hauts que ceux obtenus avec la dulcitol. Ceci nous indique que dans la fixation du « colititre-lactose » interviennent non seulement les *B. Coli* non fécaux, mais aussi les *B. paracoli* et autres germes (streptocoques, ferments lactiques, etc.) capables de fermenter le lactose, et qui constituent une partie de la flore microbienne du lait.

Au contraire, avec notre méthode, nous obtenons le colititre sur la base du colibacille dont les caractéristiques sont rapportées par tous au type « fécal », seul germe à qui l'on puisse concéder la signification nécessaire pour juger de la contamination fécale du lait. Et comme nous avons déjà suffisamment discuté de cela dans nos publications précédentes plusieurs fois citées, nous n'insisterons pas davantage.

Le critérium que nous avons soutenu, et d'après lequel on ne doit pas utiliser les milieux à base de lactose, est confirmé par l'étude comparative avec les diverses techniques que nous avons citées auparavant, de notre milieu (que nous appellerons dorénavant « Z »). Cette étude nous amène à classer ces méthodes dans l'ordre suivant :

1^o Simonds et « Z » ; 2^o Zavagli ; 3^o Kufferath et Pegallac ; et 4^o Rotemberg et Pencosm.

Avec le milieu de Pencosm, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de virage dans des tubes dont le réensemencement accusait la présence du colibacille. Avec celui de Rotemberg, nous n'avons pas vu les fluorescences dont parle l'auteur ; le milieu vire au jaune en présence du *B. Coli*. Celui de Pegallac vire au blanc rosé et donne des gaz. Avec celui de Kufferath, on obtient des colonies de *B. Coli* de surface lisse, avec bords bien définis, brillantes, grandes et aplaties. L'allongement et l'incurvation dont parle l'auteur dans les corps bacillaires seraient, à notre avis, la conséquence d'un état de variation.

Le milieu de Zavagli, qui peut être considéré fondamentalement comme un Endo liquide, dénonce le colibacille par le virage au rouge et la production de gaz. Celui de Simonds donne des colonies d'un halo jaune rougeâtre avec le *B. Coli* et le bleu verdâtre avec *B. aerogenes*. Sur ce terrain le *B. Coli* fécal se développe avec difficulté ; par contre, l'aérogène pousse très bien et vire avant 24 heures le bleu de Prusse.

Avec le milieu « Z », nous avons déjà dit qu'il se produit un virage au jaune quand se développe le colibacille de type fécal ; il reste sans aucun changement quand il s'agit de *B. aerogenes*.

Dans une première sélection de ces milieux, nous avons mis de côté ceux de Pegallac, Pencosm et Rotemberg, parce que la quantité minimum de lait qui accusait la présence du colibacille était plus importante que dans les autres.

Dans une seconde partie, nous avons essayé les milieux de Kufferath, Zavagli, Simonds et le nôtre. Nous avons trouvé avec les deux premiers des colititres plus élevés que dans les seconds, ce qui indiquait un pouvoir sélectif, et par suite une plus grande sensibilité, en faveur des derniers.

La plus petite différence s'est trouvée entre le Simonds et le « Z ». Le premier est un bon milieu pour distinguer le *B. Coli* de *B. aerogenes* ; il a cet inconvénient : le *B. Coli* (qui est ici celui qui nous intéresse) se développe difficilement ; il se prête donc beaucoup mieux à l'étude de *B. aerogenes*. D'autre part, le milieu de Simonds requiert certains soins et de la précision dans sa préparation,

chose qui, si elle n'a pas d'importance dans les laboratoires spécialisés, est un inconvénient quand il s'agit de techniques d'application à la pratique laitière.

En outre, l'apparition des colonies de *B. Coli* avec le halo jaune est plus lente que le virage du milieu « Z ». Ces colonies de halo jaunâtre réensemencées dans le milieu « Z » ont produit le virage, tandis que les autres, nées dans la même plaque, y compris celles de halo bleu verdâtre (*B. aerogenes*), n'ont pas produit le virage. Cette méthode nous a servi par conséquent pour constater une fois de plus la sélectivité du milieu « Z » en ce qui concerne sa capacité de différenciation du *B. Coli* et de *B. aerogenes*.

D'autre part, il est nécessaire de vérifier le mécanisme de la sélection du milieu de Simonds, qui paraît due à la présence du citrate, ce milieu étant, en somme, un milieu synthétique.

L'action sélective de la dulcité est donc hors de doute. Cependant, le mécanisme intime de la fermentation de ce « sucre » par le *Coli* n'est pas très clair. A cet objet, nous tenons actuellement en marche quelques investigations qui, nous l'espérons, nous éclaireront sur ce point concret.

De toutes façons nous dirons que le dit procédé fermentatif doit être compliqué puisque le colibacille existe dans le lait en présence d'autres germes, et cette véritable culture associée doit rendre plus complexe la fermentation et influencera peut-être l'activité du germe.

On sait en effet que le *B. Coli* perd la propriété de donner des gaz avec le lactose en présence du *B. paratyphique* B et du *B. de Gärtner*. Cette influence de la culture associée doit être nulle ou minimum dans le cas de la dulcité. En effet, nous avons fait des essais qui montrent que, si l'on maintient à l'étuve les tubes ensemencés qui n'ont pas viré au jaune, le développement des autres germes ensemencés avec le lait ne modifie nullement la couleur du milieu. Au contraire, quand il est en présence du colibacille, il vire et souvent très vite.

Ces expériences nous démontrent qu'en présence de la dulcité, le virage du rouge de phénol, dans nos conditions, ne se réalise que quand le colibacille est présent dans le lait ensemencé. Nous avons maintenu à l'étuve pendant plusieurs jours les tubes non virés et il s'est produit un abondant développement microbien (fort trouble et formation de voiles ou anneaux à la surface des tubes), sans virage tardif : ceci prouve que la croissance des autres germes du lait, dans lesdites conditions, différents du *B. Coli*, ne sont pas capables de faire virer le milieu.

Dans le cours des recherches que nous effectuons, nous suivons le cours du développement des cultures avec courbe de la multipli-

cation du germe et des variations du pH de la culture. Nous espérons que le résultat nous conduira à une meilleure connaissance de ces faits.

Ce qui reste donc bien manifeste, c'est l'action, que nous pourrions appeler « spécifique », de la dulcité dans le procédé pour lequel nous proposons de l'utiliser.

Dans l'application pratique de la méthode, il est nécessaire de faire lesensemencements et les dilutions selon la technique que nous avons exposée. S'il s'agit d'un lait cru, il suffira d'ensemencer des dilutions à 1/100^e, 1/1.000^e et 1/10.000^e par exemple.

Pour le moment, la colimétrie ne trouve pas de grandes applications dans le contrôle du lait cru, mais on peut supposer qu'elle trouvera ses applications dans l'avenir lorsqu'on se sera mis d'accord sur la technique, sur le colitre tolérable et sur d'autres points d'importance fondamentale. Mais, où la colimétrie rend de magnifiques services, c'est dans le contrôle du lait pasteurisé ou stassanisé.

Nous avons réalisé l'étude expérimentale (1) de la stassanisation à la station de l'Institut Municipal de puériculture de Valladolid, et nous avons pu constater les inestimables services que rend la méthode dans le contrôle du fonctionnement des appareils. Nous disons en passant que, dans ces travaux, nous avons vérifié aussi les qualités de la méthode de Stassano et sa supériorité sur la pasteurisation.

Dans ces circonstances on peut faire desensemencements compris entre 0 cm³ 5 et 0 cm³ 01 du lait sans diluer, et ensuite, étant bien entendu que le lait soumis à ces traitements ne doit pas contenir de *B. Coli* dans 1 cm³ ou dans 0 cm³ 01, il suffit d'ensemencer deux tubes avec cette quantité et de les accompagner d'un témoin en permanence dans l'étuve : si le jour suivant les deux tubes ont viré au jaune, le *Coli* existe dans cette quantité et l'on doit ordonner une inspection des machines ou des autres appareils d'élaboration employés dans la pasteurisation ou stassanisation.

Quand on ensemence 1 cm³ de lait pur, on doit en utiliser 2 du milieu, et diluer au double celui de lait dans une eau physiologique stérile, pour que la couleur rouge du milieu continue d'être bien visible au lieu d'être masquée par la blancheur d'une quantité aussi grande de lait.

Les expériences exposées dans nos publications antérieures montrent comment l'application de la méthode permet de découvrir le manque de soins de propreté dans l'opération de la traite, puisque ce défaut se reflète parfaitement dans les résultats de la colimétrie,

(1) E. ZAPATERO et J. M. BRUNA. L'hygiénisation du lait par la méthode de Stassano, *Revue de Hig. y San. Pub.*, Madrid, décembre 1933.

qui sont altérés par un simple lavage des mains de celui qui fait la traite, lavage qui se traduit par un abaissement considérable du colititre obtenu.

Nous croyons par conséquent avoir donné un procédé très comode, simple, exact et d'application facile pour le contrôle bactériologique du lait.

(Valladolid, décembre 1935.)

LA RECHERCHE ET LE DOSAGE DE L'URINE DANS LE LAIT

par

D^r LASCAR BURUIANA

(Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine Vétérinaire
de Bucarest.)

On ne cite, jusqu'à ce jour, aucun cas de fraude consistant le coupage du lait avec de l'urine, quoique cette falsification puisse passer inaperçue, à cause de la difficulté de la reconnaître à l'aide des méthodes employées pour déceler le coupage avec de l'eau. Pour vérifier cette affirmation nous avons préparé quelques échantillons dans lesquels le taux de l'urine était de 30 % et nous avons déterminé, avant et après, les constantes suivantes : densité, indice de réfraction, et point cryoscopique. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU I.

Echantillon de lait Numéros (1)	Densité		Indice de réfraction		Point cryoscopique	
	Lait pur	Lait avec 30 % d'urine	Lait pur	Lait avec 30 % d'urine	Lait pur	Lait avec 30 % d'urine
1	1027,2	1026,8	35,5	36	-0,51	-0,90
2	1029	1029,3	38,5	38,7	-0,53	-0,78
3	1031	1032	39	39	-0,51	-0,72
4	1032	1032,5	38,5	39	-0,54	-0,80

(1) L'échantillon (1) était falsifié avec de l'urine humaine, de densité 1023 ; les autres, avec de l'urine de vache qui, on le sait, a une densité plus forte (variations entre 1030-1045).