



LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

- J. PIEN, J. LIGNAC et P. CLAUDE. — Détection biologique des antiseptiques et des antibiotiques dans le lait 369
- Cristino Garcia ALFONSO et Enrique Castellá BERTRAN. — Anhydrase carbonique rhodanase et phosphomonoestérase alcaline dans les laits de vache, de chèvre et de brebis 386
- A. LEROY, H. HEIM de BALSAC, J. DELAYE et J. POLY. — Les courbes de lactation : leur intérêt en élevage 394

REVUE :

- G. GÉNIN. — L'industrie laitière dans le monde. 401

Bibliographie analytique :

- 1° Les livres 407
- 2° Journaux, Revues, Sociétés savantes 419
- 3° Brevets 450

Bulletin bibliographique :

- Journaux, Revues, Sociétés savantes 455

Supplément technique :

- G. GÉNIN. — Une meilleure utilisation des sous-produits du lait facilite le problème des eaux résiduaires de laiterie 458

BULLETIN ANALYTIQUE :

- 1° Revues 465
- 2° Brevets 470

Documents et informations :

- XIII^e Congrès international d'industrie laitière 475
- L'industrie laitière espagnole 477
- Les camions laitiers réfrigérés à portes mécaniques conservent les produits laitiers et améliorent les livraisons 479
- Premier Salon de l'équipement laitier 480
- XXVI^e Salon international de la machine agricole. 480

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

DÉTECTION BIOLOGIQUE DES ANTISEPTIQUES ET DES ANTIBIOTIQUES DANS LE LAIT

par

J. PIEN, J. LIGNAC et P. CLAUDE

La recherche des antiseptiques dans le lait constitue une difficulté technique considérable pour plusieurs raisons : d'abord, quand le lait présente les caractères qui le font soupçonner de ren-

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

fermer une substance inhibitrice, on n'est jamais certain *a priori* qu'il s'agit d'antiseptiques et l'on court le risque de procéder en pure perte à leur recherche systématique ; ensuite, en admettant même que l'on soit en présence d'un antiseptique, il est nécessaire de rechercher et de doser l'une après l'autre toutes les substances chimiques susceptibles d'avoir pu être introduites frauduleusement dans le lait ; or la liste des antiseptiques est déjà longue (elle s'accroît sans cesse) et le problème ainsi posé, déjà très difficile à résoudre, risque de devenir pratiquement insoluble à plus ou moins brève échéance.

Nous avons pensé qu'il fallait reprendre cette étude sur des bases entièrement différentes et nous avons imaginé de faire appel à des techniques bactériologiques particulières pour répondre aux quatre questions suivantes :

1. Le lait renferme-t-il un facteur inhibiteur ?
2. Dans l'affirmative, ce facteur est-il constitué par un micro-organisme, un virus, une substance antigénique naturelle, un antibiotique (naturel ou artificiel), un antiseptique ?
3. Ayant éliminé les facteurs biologiques ou bactériologiques naturels, de quel antiseptique ou antibiotique s'agit-il ?
4. Enfin, ayant précisé la nature de la substance inhibitrice, quelle en est, approximativement, la concentration dans le lait ?

Nous allons étudier systématiquement chacune de ces questions en insistant particulièrement sur les points où nous croyons avoir apporté une contribution entièrement nouvelle.

* * *

Mise en évidence d'un facteur inhibiteur dans le lait

Le lait cru contient toujours une flore variée (au sein de laquelle les ferments lactiques sont généralement en grande majorité) dont l'évolution spontanée se traduit par l'altération du lait. Après une période d'inhibition naturelle assez brève, due à ce qu'on appelle le « pouvoir bactéricide » du lait, celui-ci, sous l'influence des bactéries qui l'habitent dès l'émission (et même avant) s'acidifie, d'abord lentement puis de plus en plus vite, et finit par se coaguler quand le complexe phosphocasinatque est suffisamment décalcifié par l'acide lactique produit. La rapidité de cette transformation est fonction de la température et du nombre de microorganismes présents au départ ou introduits ultérieurement à la faveur des contaminations.

Quelles que soient les conditions qui ont présidé à la récolte et à la conservation du lait, cette altération est inéluctable si aucun

facteur d'inhibition ne vient empêcher la prolifération et l'activité des microorganismes présents. Le problème de la recherche éventuelle de semblables facteurs ne se pose donc que si l'évolution spontanée du lait n'est pas constatée : ainsi, dans l'industrie fromagère, le problème se pose lorsque l'acidification spontanée du lait ou du sérum ne se produit pas ou ne suit pas une allure normale ; dans le cas du lait cru vendu en l'état, l'attention du consommateur et des agents de la Répression des Fraudes est éveillée lorsqu'un échantillon, non additionné de conservateur, reste plusieurs jours à la température ordinaire sans se coaguler, etc.

De sorte que la question de rechercher un facteur d'inhibition dans le lait cru ne se pose, en général que lorsque la présence de ce facteur a déjà été constatée ou au moins soupçonnée.

Dans le cas du *lait pasteurisé*, à une différence de degré près, le problème se présente de la même façon. Le lait pasteurisé n'est pas stérile. Il renferme d'abord les germes que le chauffage à 80° ou même 90° n'a pas pu détruire (certains microcoques très thermorésistants et, bien entendu, tous les sporulés) puis les germes réintroduits à la faveur des contaminations plus ou moins inévitables. Si, dans ce cas, les ferments lactiques ne sont pas en majorité, ils sont néanmoins présents, accompagnés d'ailleurs d'autres ferments acidifiants sporulés ; leur développement, rapide à la température ordinaire, l'emporte parfois sur celui des autres germes et peut entraîner l'acidification puis le caillage du lait. D'ailleurs les autres micro-organismes présents dans le lait pasteurisé sont également des facteurs d'altération. Certains sont fortement protéolytiques, d'autres, sporulés ou non, produisent des gaz, etc. De sorte que, en l'absence de facteurs d'inhibition, l'altération du lait pasteurisé est également un fait inéluctable, moins rapide que dans le cas du lait cru, mais susceptible d'être observé dans des délais assez courts dont la durée dépend des conditions qui ont présidé à la récolte du lait cru (sporulés) de celles dont on a entouré la pasteurisation et le conditionnement du lait (contamination) et de la température de conservation.

Quoi qu'il en soit le consommateur, l'agent de la Répression des Fraudes, etc., soupçonnent la présence d'antiseptiques (ou d'une manière plus générale de facteurs d'inhibition thermorésistants) si le lait pasteurisé reste apparemment intact pendant un délai anormalement long. Là encore l'idée de rechercher un conservateur ou un antibiotique (au sens large) ne se greffe que sur la constatation que la présence de ce facteur ou de cette substance est déjà très probable sinon certaine.

Il semble donc, aussi bien dans le cas du lait pasteurisé que dans le cas du lait cru, que la mise en évidence d'un facteur d'inhibi-

tion soit inutile. Dans la majorité des cas, cela est vrai. Toutefois nous pensons qu'il y a lieu de confirmer l'hypothèse primitive par une recherche directe pour la raison suivante : si le lait initial était bactériologiquement très propre, si la pasteurisation et les opérations de conditionnement (embouteillage notamment) ont été effectuées avec de très bonnes précautions d'asepsie, si la température de conservation a été très basse, les délais habituellement constatés pour l'altération du lait peuvent être très largement dépassés. Aux Etats-Unis, où toutes ces conditions sont généralement respectées, on ne considère plus le lait comme une denrée périssable : le lait en bouteilles, aseptique et stocké à basse température est encore parfaitement consommable une semaine après la pasteurisation. En France même, les conditions de la pasteurisation et de l'embouteillage s'améliorent sans cesse ; la conservabilité du lait progresse ; si les conditions de la production suivaient la même marche, il n'est pas douteux que les brefs délais de conservation que nous avons connus et qui s'allongent actuellement, parviendraient à rejoindre ceux que l'on constate dans certains pays étrangers.

Donc, dans le but d'éviter une inutile recherche de facteurs d'inhibition, il semble nécessaire, même en cas de présomption, de faire d'abord globalement la preuve de leur présence éventuelle.

A cette manière de voir, on peut faire l'objection suivante : si le lait a contenu un inhibiteur fugace, le fait de différer la recherche directe du facteur lui-même peut lui laisser le temps de disparaître pendant que l'on cherchera à s'administrer la preuve de la présence d'un inhibiteur quelconque. Cela n'est vrai que pour des antiseptiques et pour un seul d'entre eux : l'eau oxygénée. Etant donné l'extrême facilité et la rapidité de la recherche de cet antiseptique, nous conseillons de toujours le rechercher, de préférence par la méthode sensible que nous avons mise au point (1) dès la réception d'un échantillon dans lequel on soupçonne la présence d'un facteur d'inhibition.

En dehors de ce cas particulier (c'est-à-dire pour tous les laits suspects où la présence de l'eau oxygénée n'a pas pu être mise en évidence) nous conseillons vivement de confirmer le soupçon initial par la « mise en évidence d'un facteur d'inhibition » dans l'échantillon de lait soumis à l'examen (2).

La technique à employer est fort simple et ne constitue pas une innovation : il suffit d'ensemencer le lait avec une quantité connue d'un ferment lactique pur quelconque et de comparer l'acidification

(1) *Communication à la Société des Experts chimistes, séance du 20 mai 1953.*

(2) Il va de soi qu'il s'agit d'échantillons *non additionnés de conservateur* par l'agent chargé du prélèvement.

de cet échantillon à celle d'un échantillon de lait authentique, stérile, traité dans les mêmes conditions. Si une différence *notable* est constatée dans la marche de l'acidification, on en déduira que le lait suspect renferme effectivement un facteur d'inhibition (naturel ou introduit).

Une remarque s'impose : on pourrait être tenté de comparer les deux tubes après vingt-quatre heures d'étuve ; en opérant ainsi on commettrait, dans certains cas, une erreur. Si le facteur d'inhibition présent n'est pas très actif ou très abondant, il peut en résulter un simple retard de quelques heures dans l'acidification, avec comme terme final, une coagulation et une acidité identiques après un délai suffisant (24 heures d'étuve par exemple). Le ferment lactique introduit peut, en effet, vaincre ces conditions peu sévères et « rattraper » le retard par rapport au témoin. C'est pourquoi il est indispensable de préparer plusieurs tubes semblables et de noter les acidités acquises pendant les premières heures d'incubation (par exemple après 4, 6, 8 heures d'étuve). Cette comparaison peut même suffire, sans attendre le caillage du témoin, dans le cas où le tube suspect présente un retard d'acidification. En revanche, dans d'autres cas, la fermentation lactique peut démarrer identiquement dans les deux tubes et le retard ne s'établir et s'aggraver qu'après huit ou dix heures. Il est donc nécessaire, dans ce cas, de poursuivre la comparaison jusqu'au lendemain.

Enfin il convient de noter que le titrage de l'acidité produite pourrait être remplacé par une épreuve d'oxydo-réduction (bleu de méthylène, résazurine) qui pourrait fournir une réponse plus rapide. Mais cela n'est valable que dans le cas où le retard d'acidification se produirait dans les premières heures d'incubation. Si ce retard n'intervient que beaucoup plus tard, c'est seulement la mesure de l'acidité après un nombre d'heures suffisant qui peut renseigner. C'est pourquoi nous préférons maintenir le contrôle acidimétrique au cours et au terme de l'épreuve.

Voici donc le *mode opératoire* que nous proposons :

1. Entretien de la souche de ferment lactique.

On peut utiliser n'importe quel bon ferment lactique pur du commerce (culture en lait, ou culture sèche rénovée par passages en lait). L'entretien de cette culture se fera par repiquage quotidiens *au fil droit* dans 10 cm³ de lait écrémé stérile (c'est-à-dire à un taux d'ensemencement inférieur à 1/10.000^e). Les tubes de lait seront stérilisés par passage à l'autoclave à 120° pendant dix minutes (cas d'un petit autoclave de laboratoire). Les tubes ensemencés seront abandonnés vingt-quatre heures à la température ordinaire (18-20°).

On pourra, chaque semaine, interrompre le repiquage une fois, ou deux au maximum, à condition qu'il ait lieu régulièrement tous les autres jours. On dispose ainsi tous les jours d'une culture de ferment lactique en pleine activité, utilisable à tout moment et de conservation quasi-indéfinie. Pour l'emploi, préparer une dilution d'une souche de vingt-quatre heures à raison de 0 cm³ 1 dans 10 cm³ d'eau ou de lait stérile.

2. Exécution de l'essai.

Dans trois tubes de 18 × 180 bouchés à l'ouate et stérilisés dans les conditions classiques, introduire aseptiquement 10 cm³ (ou 5 à la rigueur) de l'échantillon suspect. Préparer d'autre part trois tubes de lait stérile (entier ou écrémé) exempt d'antiseptiques ou d'antibiotiques, contenant le même volume de lait que les précédents.

Ensemencer aseptiquement les six tubes à la pipette avec 0 cm³ 1 de la dilution de ferment au 1/100^e préparée comme il est dit ci-dessus. Agiter sommairement les tubes sans les retourner et les placer au thermostat ou à l'étuve à 30°.

Après quatre ou six heures, puis six ou huit heures, puis vingt ou vingt-quatre heures titrer l'acidité du contenu d'un tube de lait suspect et d'un tube de lait témoin.

3. Interprétation.

Si les acidités constatées dans les tubes de lait suspect ne sont pas inférieures de plus de 5% à celles des tubes témoins, on peut affirmer que le lait suspect ne renfermait aucun facteur d'inhibition.

Si l'écart est de l'ordre de 10% soit au début, soit à la fin de l'incubation on peut soupçonner la présence d'une substance retardatrice, naturelle ou non, mais à faible concentration et il est difficile, en tout cas, d'affirmer que l'on se trouve en présence d'un antiseptique ajouté frauduleusement.

Ce n'est que si les écarts, surtout dans les premières heures, sont très importants (plus de 20% par exemple) que l'on peut envisager de poursuivre l'examen.

Il va de soi que si le lait suspect n'est pas coagulé dans les vingt-vingt-quatre heures (alors que le témoin l'est) on peut affirmer l'existence de facteurs d'inhibition actifs et abondants.

Remarque. — Il peut arriver, si le lait « suspect » est normal, qu'il s'acidifie plus vite que le témoin, puisqu'il renferme déjà des ferments naturels, qu'il est cru et qu'il peut être mieux pourvu en facteurs de croissance que le témoin stérilisé.

Cette première épreuve permet d'affirmer ou non la présence

dans le lait examiné de facteurs d'inhibition de la fermentation lactique. Il s'agit maintenant d'essayer de déterminer à quelle classe ils appartiennent.

* * *

Distinction entre certains facteurs d'inhibition naturels et les substances susceptibles d'avoir été introduites dans le lait

Les causes susceptibles de gêner la fermentation lactique dans le lait (c'est-à-dire d'agir comme le ferait un antiseptique) sont nombreuses : microorganismes ou virus gênant ou inhibant sélectivement les ferments lactiques (bactériophages par exemple) substances antigéniques produites par l'animal à l'occasion d'une infection et passant dans le lait directement ou par l'intermédiaire des leucocytes, antibiotiques résultant du traitement d'une maladie de la vache (mammite par exemple) et se retrouvant en grande partie dans le lait, antibiotiques introduits frauduleusement dans le lait pour assurer sa conservation, enfin antiseptiques additionnés au lait dans le même but.

Il est évident qu'il est du plus haut intérêt de discerner à laquelle de ces classes appartient le facteur inhibiteur dont on aura constaté la présence par l'épreuve précédente. Faute de quoi, on risquerait d'interpréter comme une fraude ce qui ne serait qu'un phénomène naturel. D'autre part l'industrie laitière a le plus grand besoin de connaître, au moins dans ses grandes lignes, la nature des phénomènes inhibiteurs qui, parfois, compromettent les fabrications basées sur la fermentation lactique.

Fort heureusement, un caractère facile à mettre en évidence va nous permettre une distinction assez rigoureuse des diverses classes dont nous venons de parler : il s'agit de leur *thermorésistance*. Les bactériophages, les bactéries qui gênent la fermentation lactique (1), la plupart des substances antigéniques secrétés par l'animal ne résistent pas au chauffage à 90-95°, alors que les antibiotiques et les antiseptiques introduits dans le lait sont respectés à cette température. Nous avons là un excellent moyen de distinguer d'une manière suffisante pour le but poursuivi ici, les facteurs d'inhibition formés ou apportés dans le lait par des phénomènes naturels et ceux qui ont été introduits par l'homme : antiseptiques et antibiotiques (2).

(1) Certaines de ces bactéries, sensibles à la chaleur, secrètent des diastases antibiotiques thermorésistantes. Nous verrons plus loin comment l'emploi de souches de ferments lactiques à résistance spécifique permet d'échapper à cette difficulté.

(2) Il restera à faire la distinction entre les antibiotiques résultant d'un traitement vétérinaire de l'animal et les antibiotiques introduits directement dans le lait par un fraudeur. Voir ci-après.

La technique permettant de réaliser cette distinction est des plus simples : il suffit de répéter les opérations décrites plus haut sur un échantillon de lait suspect soumis à un chauffage de quelques instants à 95°. En fait, pour gagner du temps, il est à conseiller de mener de front ces deux opérations. On pourrait même n'effectuer cette recherche que sur le lait chauffé. Mais on se priverait par là du moyen d'affirmer qu'il y avait bien dans le lait un facteur inhibiteur et que ce facteur n'était pas d'origine frauduleuse. D'autre part, il est important pour l'industriel de savoir que l'inhibition constatée est, ou non, thermostable.

Le *mode opératoire* permettant cette classification de la nature du facteur gênant sera le suivant :

1. Chauffage de l'échantillon de lait suspect.

Trois tubes à essai stériles garnis, comme il a été dit plus haut, de 5 ou 10 cm³ de lait suspect sont plongés dans un bain-marie bouillant pendant un temps suffisant pour que la température du contenu des tubes atteigne au moins 95° (un tube identique contenant le même volume d'eau dans lequel plonge un thermomètre permet la surveillance du chauffage). Quand cette température est atteinte, la maintenir pendant une demi-minute puis refroidir les tubes sous un courant d'eau.

2. Exécution de l'essai.

Procéder exactement comme dans le cas précédent.

3. Interprétation.

Si l'on s'est contenté de faire l'épreuve sur le lait suspect chauffé, la comparaison avec le lait témoin comporte la même interprétation que dans le cas précédent.

Si l'on a exécuté l'essai à la fois sur le lait suspect non chauffé et sur le même lait chauffé, la comparaison des résultats entre ces deux séries d'échantillons mène aux commentaires suivants :

— ou bien les deux séries de tubes du lait suspect (chauffé et non chauffé) conduisent l'un et l'autre à des retards d'acidification considérables par rapport au lait témoin : présence d'antiseptiques ou d'antibiotiques à doses inhibitrices ;

— ou bien la série « lait non chauffé » présente ce retard alors que la série « lait chauffé » se comporte à peu près comme le témoin (aux écarts prévus) : présence de facteurs inhibiteurs thermostables, donc autres que les antibiotiques vétérinaires (pénicilline, auréomycine, streptomycine...) et les antiseptiques chimiques.

Cette double épreuve fondamentale nous aura donc permis, avec une certitude suffisante pour le but poursuivi ici, d'affirmer

que le lait suspect, présentant un net caractère d'inhibition de la fermentation lactique, le doit ou, non, à des substances (médicaments ou produits chimiques) introduites directement ou indirectement par l'homme.

* * *

Détermination de la nature de l'antiseptique ou de l'antibiotique présent dans le lait

Il s'agit maintenant de rechercher la nature exacte de l'antiseptique ou de l'antibiotique dont la présence a été reconnue dans le lait.

Voici les étapes successives qui nous ont menés à la mise au point de la méthode que nous proposons :

I. — Quand on étudie la résistance des microorganismes (ferments lactiques par exemple) aux antiseptiques et aux antibiotiques, on constate l'existence de deux concentrations remarquables, déterminant trois zones d'activité.

a) Au-dessous d'une certaine concentration (*seuil de toxicité*) la fermentation lactique se poursuit normalement ;

b) A partir de la concentration qui correspond au seuil de toxicité, la fermentation est gênée et cela de plus en plus au fur et à mesure que la concentration augmente ;

c) On rencontre enfin une certaine concentration pour laquelle la fermentation lactique est complètement arrêtée (*dose inhibitrice*).

Nous avons déterminé expérimentalement la valeur des deux concentrations intéressantes, pour la souche de *Str. lactis* que nous utilisons, vis-à-vis des principaux antiseptiques et antibiotiques. Voici quelques-uns des résultats obtenus :

	Seuil de toxicité (par litre)	Dose inhibitrice (par litre)
Formol à 30 %	0,015 gr. par litre	0,3 gr. par litre
Formol en HCHO	0,005 » »	0,1 » »
Acide borique	0,6 » »	3,0 » »
Borate de soude	1,0 » »	3,0 » »
Acide benzoïque	0,4 » »	1,0 » »
Benzoate de soude	0,5 » »	3,5 » »
Acide salicylique	0,2 » »	1,0 » »
Salicylate de soude	0,2 » »	2,0 » »
Fluorure de sodium	0,005 » »	2,0 » »
Ammonium quaternaire	0,002 » »	0,1 » »
Eau de javel à 12° chl.	0,8 cm ³ »	20 cm ³ »
Eau oxygénée à 10 vol.	0,5 cm ³ »	5,0 cm ³ »

Bromacétate d'éthylène-glycol	0,045 mgr. »	7,5 mgr. »
Streptomycine	0,5 mgr. »	5 mgr. »
Auréomycine	0,1 mgr. »	0,5 mgr. »
Penicilline	0,01 U.O./cm ³	0,3 U.O./cm ³

II. — Or nous avons constaté que si un ferment lactique est mis en contact avec une dose d'antiseptique ou d'antibiotique légèrement supérieure au seuil de toxicité, la fermentation, d'abord retardée, finit, après plusieurs repiquages dans les mêmes conditions, par redevenir normale : le ferment s'est entraîné à travailler en présence de doses légèrement toxiques.

En poursuivant l'expérience par des repiquages successifs dans des laits renfermant des concentrations de plus en plus élevées de la substance toxique, on parvient à habituer le ferment à travailler normalement, non seulement dans la zone de toxicité, mais aussi dans la zone des concentrations totalement inhibitrices.

Nous avons ainsi créé des souches d'un même ferment lactique devenues, après plusieurs mois ou plusieurs années d'entraînement méthodique, capable de produire une fermentation parfaitement normale (rapidité, acidité...) dans des laits renfermant une ou plusieurs fois la concentration inhibitrice (1).

(Dans le cas particulier des antibiotiques nous avons, en deux ans, créé une souche capable de résister à 5 U.O. de pénicilline par centimètre cube, c'est-à-dire dix-sept fois la dose totalement inhibitrice).

III. — Nous avons d'autre part constaté que *la résistance ainsi acquise était spécifique* : une souche entraînée à résister à des concentrations élevées d'un antiseptique ou d'une antibiotique donnés, *conserve sa sensibilité initiale vis-à-vis de tous les autres*.

La résistance spécifique ainsi obtenue subsiste aussi longtemps que se poursuivent les repiquages de la souche en lait additionné de la dose voulue d'antiseptique ou d'antibiotique. On constate même que la résistance se maintient un certain temps (mais non indéfiniment) si la souche est repiquée en lait ordinaire. Le nombre de passages que l'on peut ainsi faire subir à la souche en lait non anti-

(1) L'idée de créer des souches pénicillino-résistantes n'est pas nouvelle. De nombreuses études ont déjà été entreprises dans ce domaine pour permettre, dans le travail industriel, de pallier l'inconvénient qui résulte de la présence de cet antibiotique dans les laits.

En revanche, la création de souches résistant spécifiquement aux divers antiseptiques (et aux divers antibiotiques) dans le but de dépister leur présence, et éventuellement leur concentration dans le lait (voir ci-après) ne semble pas avoir été tentée jusqu'ici.

septique ou non antibiotique sans lui faire perdre la résistance acquise, varie suivant la nature et la concentration des substances utilisées (ainsi, dans le cas de la résistance à la pénicilline, on peut réaliser 15 passages en lait ordinaire avant de commencer à voir baisser la résistance acquise ce qui, notamment, est largement suffisant pour permettre l'emploi industriel de ces souches).

IV. — Ayant donc à notre disposition une collection de souches (d'un même ferment lactique) entraînées à résister aux doses inhibitrices des principaux antiseptiques et antibiotiques, le dépistage d'une de ces substances dans un lait se fera de la manière suivante : plusieurs échantillons de ce lait sont ensemencés chacun avec l'une des souches résistantes et soumis à l'incubation ; toutes les souches seront inhibées *sauf celle qui est entraînée à résister à l'antiseptique ou à l'antibiotique présent*, dont la nature sera ainsi automatiquement connue dès que la fermentation lactique aura démarré.

Mode opératoire détaillé

1. Création de souches résistantes.

Dissoudre dans un certain volume de lait écrémé la quantité de l'antiseptique correspondant à la dose du seuil de toxicité ou à une dose inférieure à celles que nous avons nous-mêmes déterminées pour notre souche de *Str. lactis* (voir plus haut). Répartir en tubes de 10 cm³, stériliser à l'autoclave.

Dans le cas des antibiotiques, il est préférable de stériliser le lait d'abord, puis d'ajouter ensuite, aseptiquement, des solutions d'antibiotiques (on peut également opérer ainsi dans le cas des antiseptiques acides).

Procéder de la même façon pour tous les autres antiseptiques et antibiotiques que l'on se propose de déterminer dans des laits suspects.

Ensemencer au fil droit un tube de chaque série à l'aide du ferment lactique choisi (qui peut être quelconque). Abandonner vingt-quatre heures à 30°.

Trois éventualités peuvent se présenter (pour un tube donné) :

a) Le lait est caillé ; donc la dose d'antiseptique ou d'antibiotique utilisée n'est pas trop élevée. On pourra, sans plus attendre, repiquer dans des laits contenant davantage de la substance utilisée ;

b) Le lait n'est pas caillé, mais le caillage est obtenu un peu plus tard (le lendemain ou les jours suivants). Donc la dose d'inhibiteur employée était supérieure au seuil de toxicité, mais inférieure à la

dose inhibitrice. Il convient alors de repiquer dans des tubes identiques plusieurs fois de suite jusqu'à ce que le caillage, devenant progressivement plus rapide, parvienne à se produire en vingt-quatre heures ;

c) Le lait n'est pas caillé et ne caille pas dans les jours suivants : la concentration d'inhibiteur employée était trop élevée : revenir à des doses plus faibles.

Il faut donc chercher à se trouver dans le cas b) qui correspond exactement à celui où la souche s'entraîne à résister. On ne passera à une dose plus élevée d'inhibiteur que lorsque la souche aura acquis une résistance suffisante pour produire en vingt-quatre heures le caillage du lait additionné de la dose précédente.

On constate d'ailleurs en général que c'est l'accoutumance aux plus faibles doses toxiques qui est la plus longue. Dès que la souche a commencé à résister, le passage d'une concentration donnée à une concentration plus haute devient plus rapide.

En quelques mois de repiquages quotidiens, on parvient à créer des souches résistant à une ou plusieurs doses totalement inhibitrices de tous les antiseptiques ou antibiotiques utilisés (1).

2. Exécution de l'essai.

Nous savons, d'après l'épreuve précédente, que nous avons affaire à un lait renfermant un facteur d'inhibition, que celui-ci est thermostable (antiseptique ou antibiotique) et que, par conséquent, nous avons à procéder à son identification.

Le lait suspect est alors réparti à raison de 10, 5 ou même 2 cm³ dans autant de tubes stériles que l'on possède de souches entraînées à résister aux antiseptiques et antibiotiques (par exemple 10 ou 15...). Tournesoler aseptiquement à l'aide d'une solution de tournesol stérile.

Porter sur ces tubes le nom de chacun des antiseptiques et antibiotiques que l'on se propose de rechercher.

Ensemencer chaque tube, au fil droit, avec la souche résistante correspondant à l'inhibiteur dont le nom est porté sur le tube.

Ajouter à la série un tube de lait normalensemencé avec la souche normale de ferment lactique n'ayant subi aucun entraînement (témoin).

Agiter. Porter à l'étuve à 30°. Surveiller le virage du tournesol pendant les premières heures. Noter le lendemain le tube caillé.

(1) Si cette technique devait entrer dans la pratique, il serait sans doute plus simple de s'adresser à un laboratoire spécialisé dans la préparation de ces souches résistantes (qui peuvent subir sans inconvénient quelques repiquages en lait normal) et dont la collection serait envoyée sur demande.

3. Interprétation des résultats.

En principe, si le lait suspect contient l'un des antiseptiques ou antibiotiques figurant dans la liste de ceux qui ont servi à préparer des souches résistantes, et si la quantité présente est supérieure à la dose inhibitrice, tous les tubes resteront intacts (non acides, non caillés) sauf celui qui porte le nom de l'inhibiteur présent.

Si la concentration de l'inhibiteur présent est inférieure à la dose inhibitrice, la fermentation lactique, parfaitement normale dans le tube ensemencé avec la souche résistante correspondante, n'aura pas été annulée mais seulement retardée dans les autres. Tous les tubes s'acidifieront, mais l'un d'eux s'acidifiera plus tôt. C'est pourquoi il convient de surveiller, pendant les premières heures d'incubation, la coloration du tournesol. Si, le soir, tous les tubes sont acides sans qu'aucun d'entre eux ne soit encore caillé, il convient de sortir tous les tubes de l'étuve pour conserver, jusqu'aux observations du lendemain, l'avance prise par le tube correspondant à l'inhibiteur présent.

Si aucun tube ne s'est détaché des autres et si tous les tubes sont identiquement stoppés ou retardés par rapport au témoin de lait normal (ensemencé de ferment normal) c'est que l'antibiotique ou l'antiseptique présent n'est pas l'un de ceux qui ont servi à entraîner les souches.

Si tous les tubes s'acidifient ou caillent normalement, c'est qu'il n'y a aucun inhibiteur dans le lait ou que la concentration en est inférieure aux doses du seuil de toxicité (ce cas n'est à envisager que si les essais préalables d'orientation n'ont pas eu lieu).

Remarque. — La technique que nous proposons permet donc, en un ou deux jours, de déceler, dans un lait suspect, la présence d'antiseptiques ou d'antibiotiques et d'en déterminer avec certitude la nature.

Dans le cas particulier des antiseptiques, ces épreuves pourront être suivies d'une analyse chimique limitée à la recherche d'une seule substance (donc possible dans tous les cas) afin d'avoir à la fois la confirmation des conclusions déjà acquises et la possibilité de déterminer la concentration de l'antiseptique. Il est vrai que la méthode préconisée peut elle-même permettre, ainsi qu'on va le voir, le « dosage » de l'antiseptique ou de l'antibiotique présents dans le lait.

Détermination de la concentration de l'antiseptique ou de l'antibiotique présent dans le lait

Principe de la méthode.

Il s'agit d'une simple variante de la technique précédente : supposons qu'un lait renferme 2 grammes d'acide borique par litre, c'est-à-dire une dose comprise entre le seuil de toxicité et la dose inhibitrice. La fermentation lactique, non entièrement entravée dans ce lait, y sera cependant gênée. Si l'on ensemence ce lait avec une souche entraînée à résister à des concentrations élevées, inhibitrices (comme celles dont la préparation a été décrite plus haut) on obtiendra une fermentation lactique normale, sans pouvoir déterminer la dose de l'antiseptique. Si l'on ensemence ce lait avec une série de souches entraînées à résister respectivement à 1, 2, 3 grammes d'acide borique par litre de lait, la fermentation lactique sera encore gênée dans le cas de la souche entraînée seulement à 1 gramme mais ne le sera plus dans le cas des souches entraînées à 2 et 3 grammes. D'où un procédé de dosage approximatif dont la précision n'est limitée que par le nombre de souches entraînées à résister à des concentrations successives comprises entre le seuil de toxicité et la dose inhibitrice — concentrations que l'on peut théoriquement prévoir aussi rapprochées que l'on veut. Pratiquement, cet intervalle ne peut être divisé qu'en un petit nombre de points qui dépend de la nature de l'antiseptique ou de l'antibiotique.

Mode opératoire

1. Création des souches résistantes.

Au lieu de créer, comme dans le cas précédent, des souches de ferments lactiques résistant aux plus hautes concentrations possibles d'antiseptiques ou d'antibiotiques, on arrêtera l'entraînement d'une souche à l'une des plus faibles concentrations choisies dans la zone retardatrice ; on poursuivra l'entraînement d'une seconde souche jusqu'à la concentration suivante, etc. Une fois ces résultats acquis, les diverses souches ainsi créées seront entretenues indéfiniment à résister à la seule concentration pour laquelle elles ont été créées. On aura ainsi constitué, pour chaque antiseptique ou antibiotique, une collection de plusieurs souches capables de résister spécifiquement à des concentrations différentes (une souche adaptée à une concentration donnée reste sensible aux concentrations plus élevées).

2. Exécution de l'essai.

Il ne saurait être question d'entreprendre simultanément pour tous les antiseptiques et tous les antibiotiques possibles, l'examen

de toutes les concentrations choisies. On aboutirait à un trop grand nombre d'essais (plus de 50).

Ayant acquis, grâce à l'essai précédent, la certitude de la présence dans le lait suspect d'un antiseptique ou d'un antibiotique donné, on procédera, le jour suivant, à la détermination de la concentration approximative de cette substance en utilisant seulement la collection des quelques souches créées pour résister aux diverses concentrations de cette unique substance.

La technique sera la même que dans le cas précédent.

L'interprétation du résultat ne soulèvera aucune difficulté : soit A g par litre la concentration de l'antiseptique ou de l'antibiotique présent. Toutes les souches entraînées à résister à des concentrations inférieures à A fourniront une fermentation lactique nulle ou ralentie. Toutes les souches entraînées à résister à des concentrations égales ou supérieures à A donneront naissance à une fermentation lactique normale, c'est-à-dire identique à celle du témoin et identiques entre elles.

Remarque. — Ayant ainsi identifié, ou même dosé approximativement, le facteur inhibiteur introduit dans le lait, la question se pose de savoir s'il s'agit ou non d'une fraude. En ce qui concerne les antiseptiques (même s'ils proviennent de l'emploi inconsidéré de produits détersifs ou désinfectants pour le nettoyage de la vaisselle laitière) il n'est pas douteux que l'on se trouve toujours en présence d'une opération frauduleuse, puisqu'aussi bien les produits désinfectants doivent obligatoirement être éliminés par le rinçage du matériel. Le cas des antibiotiques est différent : s'agit-il, par exemple, de pénicilline évacuée par l'animal dans le lait à la suite du traitement d'une mammite, ou de l'introduction directe, volontaire, d'antibiotique dans le but d'augmenter frauduleusement la conservabilité du lait ? Cette distinction est impossible à faire, sauf (dans certains cas) si l'on prend en considération la concentration de l'antibiotique. Ainsi dans un lait de mélange de plusieurs vaches et *a fortiori* de plusieurs exploitations, la présence d'une quantité importante, totalement inhibitrice, de pénicilline, par exemple, semble pouvoir être rapportée à une incorporation directe frauduleuse et non aux conséquences d'un traitement vétérinaire. L'enquête sur l'état du troupeau sur les traitements éventuellement subis par les animaux, sur la date de la cessation du traitement, pourra apporter des éléments d'appréciation. Il n'en reste pas moins que cette distinction sera, dans certains cas, délicate ; mais la même difficulté se présente quel que soit le mode de détermination de l'antibiotique.

Extension de la méthode des souches résistantes

La technique que nous proposons est susceptible de recevoir de nombreuses autres applications :

1. Dépistage et dosage de tous facteurs d'inhibition isolables.

Le fait que les ferments lactiques sont adaptables à des concentrations élevées de substances inhibitrices très variées permet de penser que la méthode est susceptible d'extension au dépistage de tous autres facteurs d'inhibition, pour autant que ces facteurs, connus ou non, soient isolables afin de permettre la création des souches résistantes correspondantes.

2. Création de souches polyrésistantes en technologie laitière et fromagère.

L'utilisation de souches pénicillino-résistantes n'est pas nouvelle. Mais l'emploi de ferments lactiques résistant (comme ceux que nous avons créés) à l'auroémicine, à la streptomycine, au chlore, à l'oxygène naissant, au formol, etc., c'est-à-dire à de nombreux antibiotiques et antiseptiques susceptibles de se rencontrer à des doses plus ou moins élevées dans certains laits crus, semble ouvrir une voie nouvelle dans la lutte contre les laits de fermentation anormale.

En présence de laits se prêtant mal à la fermentation lactique, mais dans lesquels il n'avait pas été possible de mettre nettement en évidence la présence d'un ou de plusieurs antiseptiques ou facteurs d'inhibition, l'ensemencement simultané, comme levain, de plusieurs souches résistantes (sous la forme d'une souche mixte, unique, polyrésistante) nous a permis de redresser instantanément des fabrications gravement compromises.

Cette technique, améliorée par la prise en considération de facteurs d'inhibition nouveaux et par la création de nombreuses souches résistantes correspondantes, permettrait, dans la pratique industrielle, d'éviter la recherche difficile des causes des fermentations anormales et de passer immédiatement à l'application d'un remède dont l'efficacité se montrerait d'autant plus grande qu'il serait davantage « polyvalent ».

3. Application de ces techniques à d'autres denrées alimentaires que le lait.

De nombreux autres produits alimentaires sont ou peuvent être le siège de fermentations diverses. La présence d'un facteur d'inhibition (d'un antiseptique par exemple) se traduit par l'arrêt de la fermentation naturelle ou d'une fermentation provoquée volontairement dans cet aliment.

Il semble possible de créer des souches (du microorganisme responsable de cette fermentation naturelle ou provoquée) entraînées à résister, comme dans le cas du lait, à divers antiseptiques ou autres substances inhibitrices. On aurait, là encore, le moyen, non seulement d'identifier ces substances étrangères, mais encore celui de lutter contre leur action défavorable.

* * *

Résumé

La recherche et le dosage des antiseptiques et des antibiotiques dans le lait pose des problèmes difficiles que nous croyons avoir résolus d'une manière très simple en utilisant des souches de ferments lactiques entraînées à résister à des doses variées de ces diverses substances (doses allant de la concentration du seuil de toxicité jusqu'aux concentrations totalement inhibitrices et au-delà).

On met d'abord en évidence la présence éventuelle d'un facteur d'inhibition dans le lait suspect en l'ensemencant d'un ferment lactique quelconque et en comparant la fermentation obtenue avec celle d'un témoin de lait normalensemencé du même ferment. On recherche ensuite (ou en même temps) en opérant de la même façon sur le même lait suspect préalablement porté à 90°, si le facteur d'inhibition est thermostable, ce qui signifierait que l'on se trouve effectivement en présence d'un antiseptique ou d'un antibiotique (et non en présence de certains inhibiteurs naturels thermolabiles).

On procède ensuite à l'identification de cette substance en ensemençant plusieurs échantillons du lait suspect à l'aide de souches entraînées à résister aux principaux antiseptiques et antibiotiques, c'est-à-dire à produire une fermentation lactique normale dans le lait en présence de concentrations ordinairement inhibitrices de ces substances. Seul l'échantillon ayant reçu la souche entraînée à résister à l'inhibiteur réellement présent sera le siège d'une fermentation lactique normale. Les autres tubes de lait suspect ayant reçu les ferments entraînés à résister aux autres inhibiteurs (non présents) ne fourniront pas de fermentation. La résistance acquise par les souches spécialement entraînées est, en effet, spécifique. Le mode d'obtention de ces souches est décrit en détail.

Enfin, connaissant la nature de l'inhibiteur présent, la détermination de sa concentration approximative résultera de la mise en œuvre d'une épreuve semblable où les différentes souches utilisées seront alors des souches entraînées à résister spécifiquement à diverses concentrations de la substance en cause.

L'ensemble du problème sera donc résolu si l'on dispose d'une

collection suffisante de souches entraînées à résister à des concentrations variées des divers antiseptiques et antibiotiques susceptibles d'être rencontrés dans le lait. Nous avons créé une telle collection. Des laboratoires spécialisés pourraient en créer de semblables, les entretenir, et les distribuer au fur et à mesure des besoins.

Cette technique des souches résistantes peut être étendue à l'étude de nombreux autres problèmes : dépistage d'autres facteurs d'inhibition (pour autant qu'ils soient isolables, même s'ils sont inconnus) création de souches mixtes polyrésistantes pour l'industrie laitière et fromagère, application des mêmes principes à la recherche des antiseptiques ou des antibiotiques dans d'autres produits que le lait et à la lutte contre certains accidents de fabrication d'origine bactériologique dans d'autres industries.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA COMPOSITION DU LAIT

**Anhydrase carbonique, rhodanase et phosphomonoestérase
alcaline dans les laits de vache, de chèvre et de brebis (1)**

par

CRISTINO GARCIA ALFONSO

et

ENRIQUE CASTELLA BERTRÁN

La composition du lait est actuellement un problème résolu, en particulier pour ce qui concerne les parties macropondérales. Parmi les éléments biologiques, les vitamines sont graduellement déterminées l'une après l'autre dans les divers laits.

En ce qui concerne les ferments, nous en connaissons parfaitement un petit groupe, qui trouve son application dans les services de contrôle pour vérifier la température à laquelle a été soumis un lait déterminé. Les autres enzymes ont été presque oubliées, manquant d'utilité pratique immédiate. Elles ne semblent pas constituer, comme les vitamines, un facteur de grande importance dans la nutrition des êtres qui consomment du lait. Leur connaissance présente seulement un simple intérêt scientifique, en tant que donnée à ajouter à celles déjà connues sur la composition du lait, ou en tant qu'indice de la circulation et de l'excrétion des enzymes organiques.

Nous apportons dans ce travail une série de données sur la carbonicoanhydrase, la rhodanase et la phosphomonoestérase

(1) *Annales de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Madrid*, 1952, vol. IV, fasc. 1, I.