

## LE CONTRÔLE D'HYGIÈNE DU LAIT LIQUIDE

FRANKLIN W. BARBER, B.S., M.S. Ph.D. \*

---

Le contrôle d'hygiène du lait liquide s'impose pour que soit livrée aux consommateurs une boisson saine de haute qualité. Ce contrôle implique des examens nombreux et attentifs, quelle que soit la forme du produit fini, c'est-à-dire qu'il s'agisse de lait liquide, de crème ou d'autres produits ou sous-produits laitiers. Il doit porter sur la santé de la vache et sur celle du fermier, sur l'état de la ferme, la traite et le matériel de traite, la livraison du lait à la laiterie, le traitement du lait et la livraison éventuelle au domicile des consommateurs.

D'autres chapitres de cette monographie ont traité des divers aspects de l'hygiène du lait jusqu'à la pasteurisation; on peut dire que le contrôle d'hygiène englobe tous ces aspects, car l'obtention d'un lait liquide de haute qualité exige une surveillance attentive de chacun des stades de la production et du traitement. Pour évaluer le produit final, on détermine s'il est conforme aux normes de qualité établies par les services de contrôle à l'échelon fédéral, provincial ou municipal.

La plupart des services de contrôle ont établi des règlements applicables à l'industrie laitière et portant sur la production à la ferme, le transport et le traitement. Ces règlements ont déjà été examinés. Mais c'est sur le produit final que l'efficacité des diverses opérations est évaluée. Bien que les normes relatives aux produits finis puissent varier d'un pays à un autre, ou même d'une municipalité à une autre, dans une zone déterminée, les normes de qualité sont généralement les mêmes :

1. Tout produit pasteurisé doit être négatif à l'épreuve de la phosphatase.
2. Tout produit pasteurisé doit contenir moins d'un certain nombre de micro-organismes par millilitre.
3. Tout produit pasteurisé doit contenir moins d'un certain nombre de coliformes par millilitre.

Lorsqu'il est conforme à ces normes et que les traitements qu'il a subis ont

---

\* Assistant Research Manager, Research and Development Division, National Dairy Products Corporation, Glenview Ill., Etats-Unis d'Amérique.

été pratiqués selon les règles imposées, le produit est considéré comme salubre et propre à être consommé.

Depuis des années, la qualité hygiénique du lait liquide est codifiée et jugée d'après des tests de laboratoire. Il est d'usage dans l'industrie laitière d'évaluer l'efficacité du traitement et la qualité du lait par les résultats de ces tests effectués sur le produit aussitôt après la pasteurisation et le conditionnement. Les contrôles de laboratoire les plus courants sont : *a*) l'épreuve de la phosphatase, *b*) la numération classique en boîtes de Pétri (NCBP) et *c*) le dénombrement des coliformes (Johns, 1953, 1955). Récemment, certains pays ont ajouté à ces tests de routine, un comptage des psychrophiles et certains contrôles de conservabilité sur le produit fini. Aux Etats-Unis et au Canada, les techniques de laboratoire destinées à évaluer la qualité hygiénique des produits laitiers ont été normalisées et exposées dans les *Standard Methods for the Examination of Dairy Products* (American Public Health Association, 1960).

#### **L'épreuve de la phosphatase, moyen de contrôle de la pasteurisation**

L'épreuve de la phosphatase est un moyen chimique de contrôle de l'efficacité du traitement; son résultat indique directement dans quelle mesure les produits pasteurisés testés sont inoffensifs. Elle est basée sur la destruction progressive, pendant le traitement thermique, d'un enzyme normalement présent dans le lait frais, la phosphatase. L'inactivation totale a lieu juste au-dessous de l'association température-durée nécessaire à la pasteurisation et au-dessus des températures qu'exige la destruction des micro-organismes pathogènes. Grâce à l'exceptionnelle sensibilité de cet enzyme aux faibles variations des opérations de pasteurisation, l'épreuve de la phosphatase est particulièrement précieuse pour déceler une recontamination par du lait frais ou pour localiser les causes d'une sous-pasteurisation.

On trouve, dans la littérature spécialisée, la description d'un certain nombre de tests permettant d'évaluer l'activité phosphatasique (Gilcreas & Davis, 1940; Kay & Graham, 1935; Sanders & Sager, 1948; Sharer, 1953); tous sont basés sur l'aptitude de la phosphatase alcaline du lait à libérer le phénol des esters phénylphosphoriques. On peut déterminer l'activité ou la quantité de cet enzyme dans un échantillon de lait par dosage colorimétrique du phénol libéré. Dans la plupart des régions des Etats-Unis et du Canada, on utilise comme épreuve d'orientation le test d'une heure de Sharer (Burgwald, 1942). Les échantillons suspects sont généralement recontrôlés par l'une des deux méthodes officielles décrites dans la onzième édition des *Standard Methods*. Dans les pays européens, on utilise surtout le test de Kay & Graham (Kästli, 1957).

L'épreuve de la phosphatase peut être considérée comme un outil précieux pour le contrôle d'hygiène du lait pasteurisé. Fay, dans une étude ancienne (1939) sur la valeur de cette épreuve, énumère comme suit les défauts de pasteurisation que cette épreuve permet de déceler.

«A. *Chambrage trop rapide*

1. Thermographes trop rapides
2. Fuites des vannes de sortie
3. Brièveté voulue de chambrage
4. Faute dans la manipulation des vannes d'un dispositif à vannes multiples

»C. *Basse température:*

*invisible sur le thermogramme*

1. Ampoule du thermomètre passant à travers la chemise de chauffage
2. Mousse mal pasteurisée contaminant le fond de la cuve au moment du soutirage
3. Ampoules des thermomètres longs touchant les revêtements de verre ou de métal d'une cuve chemisée

»B. *Basse température:*

*visible sur le thermogramme*

1. Cuves partiellement remplies — le lait ne reste pas à la température de chambrage
2. Chambres froides au début du traitement
3. Chambres exposées à un courant d'air
4. Chambres mal isolées
5. Couche froide au fond des cuves — mauvaise agitation

»D. *Addition de lait cru*

1. Vannes défectueuses ou mal fermées
2. Normalisation du lait, pendant ou après le traitement, avec du lait ou de la crème crus ou mal pasteurisés
3. Fuites dans la section de récupération
4. Passage du lait dans une installation préalablement utilisée pour du lait cru»

Chacun de ces défauts peut nuire à la pasteurisation. L'application de l'épreuve de la phosphatase, non seulement au produit fini mais également aux prélèvements effectués en cours de traitement, permet à l'exploitant de situer le matériel défectueux ou l'opération qui laisse à désirer et de prendre les mesures propres à redresser la situation. L'épreuve de la phosphatase passe pour capable de déceler :

- a) une chute de 1,5°C de la température de pasteurisation,
- b) une diminution de 5 minutes de la durée de chambrage,
- c) l'addition de 0,1 % de lait frais.

Aussi précieuse que soit cette épreuve pour le contrôle du lait pasteurisé, certaines circonstances peuvent en invalider les résultats. Il est donc indispensable de connaître les facteurs perturbateurs et de suivre rigoureusement les modalités d'application de la méthode (Barber, 1942). Les précautions à prendre sont clairement exposées dans les instructions concernant ce test (voir, par exemple, les *Standard Methods*).

Un certain nombre de chercheurs (Hammer & Olson, 1941; Barber & Frazier, 1943) ont montré que, dans certaines conditions, la phosphatase bactérienne peut fausser l'épreuve. Certains micro-organismes peuvent, en effet, produire cet enzyme en quantités suffisantes pour positiver l'épreuve d'un lait convenablement pasteurisé. Barber & Frazier ont montré que la phosphatase bactérienne est plus thermorésistante que celle du lait et que son inactivation exige 30 minutes de traitement à 76,7°C (contre 30 minutes à

62,8°C). Cette différence de thermorésistance est commode pour distinguer ces deux types de phosphatase.

Plus récemment, divers auteurs ont signalé qu'ils avaient obtenu des résultats positifs avec des produits soumis à la pasteurisation HTST (traitement très rapide à haute température) (Fram, 1957ab; Wright & Tramer, 1953ab, 1954). Il y aurait réactivation de la phosphatase lorsque les produits ont été pasteurisés à haute température, puis maintenus à des températures supérieures à celles de la réfrigération.

Fram (1957a) a observé cette réactivation dans des produits laitiers de diverses richesses en matières grasses (depuis le lait écrémé jusqu'à une crème contenant 38 % de matières grasses) après traitement selon diverses associations température-durée. Immédiatement après avoir été pasteurisés ou après avoir été stockés à 4,4°C, tous ces produits ont été négatifs. Mais après maintien à 31,1°C, on a observé une réactivation de la phosphatase dans ceux qui avaient reçu le traitement HTST, mais pas dans ceux qui avaient été pasteurisés par chambrage de longue durée. Le seuil de température du traitement rapide et le minimum de stockage à 31,1°C au-delà desquels on observe la réactivation sont fonction de la teneur en matières grasses : plus cette teneur est élevée, plus la réactivation de l'enzyme est rapide. Il est proposé, pour éliminer l'interférence due à cette réactivation de l'enzyme, d'éprouver les produits de la pasteurisation HTST soit immédiatement après la pasteurisation soit après refroidissement immédiat et conservation à moins de 4,4°C.

#### Flore bactérienne du lait

Avant d'aborder l'examen de ceux des tests bactériologiques qui jouent un rôle important dans le contrôle d'hygiène du lait liquide, il convient de mentionner les divers types de micro-organismes qui peuvent polluer le lait. Celui-ci constituant un milieu de culture idéal pour ces germes, le contrôle rigoureux de sa production, de son traitement et de sa distribution s'impose. On ne trouvera dans ce qui suit que les détails strictement nécessaires concernant les divers types de bactéries éventuellement présents dans le lait. Pour plus de détails, le lecteur pourra consulter Foster et al. (1957) et Elliker (1949). Quant aux renseignements sur les bactéries pathogènes, un article récent de Kästli (1957), les résume très bien.

Le lait trait en conditions d'aseptie n'est pas absolument exempt de bactéries, car le canal du trayon et le pis ne sont jamais tout à fait dépourvus de germes. En types et quantités, la flore microbienne du lait à sa sortie du trayon dépend de l'état de santé de la vache. Le lait issu d'un pis sain normal peut contenir en quantités variables des microcoques et des bacilles. La mammite accroît naturellement la flore bactérienne; outre les streptocoques normaux, on a observé dans certains cas la présence de microcoques (staphylocoques) et de *Pseudomonas*. Si l'animal n'est pas en bonne santé, on peut trouver dans le lait des bactéries pathogènes: mycobactéries, brucelles et rickettsies (fièvre Q).

Ensuite, pendant la traite, faute de bonnes pratiques d'hygiène, le lait peut se trouver contaminé par le pelage de la vache, les ustensiles de traite, l'air, les aliments, la poussière, le fumier, etc... Cette pollution peut introduire dans le lait nombre d'espèces de germes : ferments lactiques, bacilles sporulants, coliformes et *Pseudomonas* en particulier. S'il n'est pas convenablement et rapidement refroidi après la traite, le lait peut servir de milieu de culture à ces micro-organismes. Un lait produit dans des conditions satisfaisantes ne doit pas contenir plus de 200 000 germes par millilitre au moment de sa livraison au centre de traitement.

Dans ce centre, l'état hygiénique du matériel comme la température et la durée de conservation du lait cru ont un effet marqué sur la population bactérienne. Une bonne pasteurisation détruit tous les pathogènes et réduit le nombre des micro-organismes viables. Mais là encore, faute de bonnes pratiques de nettoyage et d'assainissement des installations, certains micro-organismes peuvent proliférer à la faveur des dépôts solides qui se forment dans les appareils. Tel est particulièrement le cas si la pasteurisation est faite par chambrage prolongé, procédé dans lequel une cuve peut servir à traiter plusieurs lots consécutifs sans nettoyage intermédiaire dans une même journée; si le lait cru contient des micro-organismes thermorésistants, ou même thermophiles, les risques de pollution sont encore plus grands.

C'est surtout à ces derniers micro-organismes que sont imputables les numérations bactériennes élevées observées parfois immédiatement après la pasteurisation, car les thermorésistants ne sont pas détruits par la pasteurisation et les thermophiles sont capables de se multiplier aux températures de chambrage prolongé et même, quoique rarement, aux températures élevées des traitements de courte durée. Les thermorésistants sont généralement des microcoques ou des microbactéries qui contaminent le lait à la ferme dans les installations et les appareils mal nettoyés et mal désinfectés. Les thermophiles peuvent aussi provenir du sol, des litières, des aliments etc. C'est surtout par suite de manutentions fâcheuses l'exposant à des températures élevées pendant des temps relativement longs que le lait peut servir de milieu de culture à la flore thermophile. Comme on l'a déjà souligné, cette multiplication peut résulter de l'emploi ininterrompu de cuves de pasteurisation que l'on omet de nettoyer entre le traitement des lots successifs. La pratique regrettable qui consiste à repasteuriser le lait de retour à la laiterie et le traitement du lait dans des cuves dépourvues de réchauffeurs de mousse, ou munies de réchauffeurs mal conçus, peuvent également favoriser la pullulation de ces micro-organismes et provoquer la contamination de l'installation et du produit.

Mais même si le lait cru était de bonne qualité et si les méthodes de manipulation et de pasteurisation ont été bonnes, le produit peut être pollué après avoir été pasteurisé. Cette pollution peut provenir de conduits, de réfrigérants, de remplisseuses et de bouteilles mal nettoyés et insuffisamment désinfectés. Faute de précautions, la condensation dans la salle de remplissage est

souvent une source sérieuse de contamination. Les principaux polluants post-pasteurisation sont généralement des coliformes et des psychrophiles.

Pratiquement, étant donné leur abondance (dans le fumier, le sol, le tractus intestinal de l'homme et des animaux, sur les ustensiles souillés) les coliformes polluent presque toujours le lait cru. Mais grâce à leur faible thermorésistance la pasteurisation les détruit le plus souvent tous et leur présence dans le lait pasteurisé est considérée comme un signe soit d'une insuffisance de la pasteurisation soit d'une contamination post-pasteurisation.

Le terme psychrophile, courant dans l'industrie laitière, est appliqué aux espèces bactériennes capables de se multiplier assez rapidement à basse température (généralement entre 1,7° et 10°C). La plupart d'entre ces germes sont des bacilles Gram négatifs, non sporulants et d'activité protéolytique variable. On les trouve dans tous les arrivages de lait cru; comme les coliformes, les thermorésistants et les thermophiles, ils font partie de la flore normale de ce lait. Leur nombre dépend des conditions d'hygiène à la production, des températures pendant les périodes d'attente et de la durée de ces périodes avant le traitement. Ils passent pour ne pas survivre aux bons traitements de pasteurisation; leur présence dans le lait pasteurisé est donc considérée comme un signe de contamination post-traitement.

Ces dernières années, les bactéries psychrophiles ont fait l'objet de nombreuses études, car les techniques modernes de manipulation et de transport du lait imposent à celui-ci des périodes de conservation plus longues à basse température avant traitement, transformation ou consommation. Thomas (1958) a fait un article de revue complète de la littérature qui traite des micro-organismes psychrophiles.

#### **Tests bactériologiques normalisés**

##### *Numération classique en boîtes de Pétri*

Le contrôle bactériologique du lait liquide repose sur l'identification et la numération des bactéries présentes. La méthode la plus ancienne et la plus courante de dénombrement est la numération classique en boîtes de Pétri (NCBP). Bien que primitivement conçue aux fins de comptage de toutes les bactéries de l'échantillon cultivé, cette méthode ne sert en fait qu'à obtenir des estimations. Les conditions du test (température d'incubation, milieu de culture, potentiel d'oxydo-réduction, agglutination bactérienne, etc...) peuvent en effet limiter le développement de certains germes dans l'échantillon. Pour que les résultats des examens bactériologiques reflètent la qualité du produit, tous les détails relatifs aux appareils, aux techniques d'ensemencement, et d'incubation, à la numération et à son expression, doivent être uniformisés de telle façon que les travaux d'un laboratoire puissent être acceptés comme décisifs par tous les intéressés. Ces détails sont exposés dans la onzième édition des *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*.

Bien que de nombreux chercheurs aient depuis longtemps admis que la valeur de la NCBP est limitée, cette méthode est précieuse en ce sens qu'elle donne un indice du soin apporté au traitement du lait et permet de vérifier si un produit répond à des normes bactériologiques déterminées. Ces normes peuvent varier d'un service de contrôle à l'autre, mais on adopte généralement comme limite 30 000 germes/ml, bien que dans certains pays la pollution du lait pasteurisé ne doive pas excéder 10 000 germes/ml. Avec l'équipement et les moyens de contrôle disponibles aujourd'hui, cette dernière norme est facile à observer; on peut même descendre à 1000 germes/ml.

#### *Dénombrement des coliformes*

Le dénombrement des coliformes a été également normalisé afin que les résultats obtenus par différents laboratoires soient comparables. Ce dénombrement peut se faire en boîtes de Pétri, mais en utilisant une gélose nutritive permettant sélectivement le développement des colonies de coliformes et inhibant la croissance des autres bactéries. On peut aussi recourir à un milieu nutritif liquide. Ces méthodes sont clairement exposées dans les *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*.

Ces deux tests sont fondés sur le fait que les coliformes sont des bacilles non sporulants, Gram négatifs, qui font fermenter le lactose en produisant de l'acide et du gaz carbonique. Dans chacune de ces deux méthodes on utilise des milieux qui inhibent la croissance de la plupart des autres espèces de germes, mais étant donné que, malgré tout, certains de ceux-ci peuvent se développer, les résultats positifs sur un premier milieu ne sont considérés que comme présomptifs. Ils doivent être confirmés par ceux d'autres tests sur de nouveaux milieux sélectifs.

La plupart des chercheurs estiment qu'à l'heure actuelle les produits pasteurisés doivent être totalement exempts de coliformes. Mais dans bien des pays, les normes sont moins strictes et n'exigent l'absence de coliformes que dans un certain nombre d'échantillons de 1,0 ou 0,1 ml (Kästli, 1957). Une enquête sur les normes relatives aux coliformes, réalisée en 1955 par le Committee on Applied Laboratory Methods de l'International Association of Milk and Food Sanitarians a donné les résultats suivants:

*Lait:* Dans 19 des Etats qui ont répondu, il y a des normes officielles, dans 19 des normes officieuses et dans 8 pas de normes. Les normes officielles sont les suivantes: dans un Etat 1 germe/ml, dans un autre 3/ml et dans un autre encore 5/ml, dans 15 Etats 10/ml; un Etat enfin n'a pas indiqué quelles sont ses normes. Quant aux normes officieuses, elles sont de 0 germe/ml dans un Etat, de 5/ml dans un autre et de 10/ml dans 17 Etats. La majorité des réponses (36) indiquent que des dénombrements sont effectués régulièrement et que l'observation des normes est satisfaisante.

#### **Autres examens bactériologiques**

La NCBP et le dénombrement des coliformes sont les examens bactériologiques qu'exigent dans de nombreux pays les services de contrôle pour l'évaluation de la qualité hygiénique du lait liquide. Mais nombre d'autres

méthodes sont souvent appliquées pour obtenir des indications plus précises sur la qualité du lait ou pour déceler l'origine d'une numération bactérienne élevée dans un produit pasteurisé et savoir quels sont les remèdes à adopter. On recourt alors fréquemment à des sondages dans la chaîne productrice, c'est-à-dire qu'on prélève des échantillons en différents points du cycle de traitement, de manière à localiser la section fautive. On soumet généralement ces échantillons à la NCBP, mais il est parfois intéressant d'appliquer des méthodes d'examen spéciales.

#### *Méthodes de numération totale*

*Technique du tube ovale.* En raison du prix élevé des milieux de culture, de la verrerie et de la main-d'œuvre nécessaires à la réalisation des NCBP, certains chercheurs se sont intéressés à d'autres méthodes de numération bactérienne totale. La technique du tube ovale proposée par Myers & Pence (1941) est applicable au lait pasteurisé du commerce et au lait cru après pasteurisation en laboratoire. On garnit des tubes ovales d'un milieu gélosé fondu et on ensemence à l'aide d'une anse qui dépose 0,01 ou 0,001 ml de lait, puis on mélange doucement. On incline les tubes de manière à obtenir une surface de 5 à 8 cm le long du tube; on laisse se solidifier le milieu, on dispose les tubes horizontalement, surface vers le bas, dans des râteliers et on fait incuber à 37°C pendant 48 heures avant de dénombrer les colonies. Cette méthode donne des résultats en bon accord avec ceux de la méthode classique et permet l'examen simultané économique de nombreux échantillons.

*Technique du tube roulant.* Similaire à la précédente, cette technique est très utilisée hors des Etats-Unis. Selon la description donnée par Thomas et al. (1952) on utilise un tube cylindrique qui, après ensemencement de l'échantillon à expertiser dans le milieu fondu, est placé sur un dispositif rotatif, de telle façon que le milieu durcisse en formant une mince couche sur les parois intérieures du tube. Après incubation, on dénombre les colonies comme précédemment. Cette technique présente les mêmes avantages que celle du tube ovale, mais exige des tubes et des bouchons spéciaux et un dispositif de dénombrement.

*Technique de la membrane filtrante.* Cette technique (Goetz & Tsuneishi, 1951), bien que mise au point et adoptée pour l'analyse de l'eau, a été appliquée à la numération bactérienne totale d'échantillons de lait. Cole (1955) l'a largement utilisée pour évaluer l'aptitude à la pasteurisation des arrivages de lait à la laiterie. Dans 20 ml d'eau stérile, on introduit, à l'aide d'une anse, 0,01 ml de lait et on passe le tout sur un filtre Millipore. On recueille ainsi sur la membrane filtrante tous les micro-organismes présents dans le lait et on place ensuite la membrane dans une petite boîte de Pétri contenant un tampon absorbant chargé de milieu nutritif. On fait incuber pendant une

nuit à la température désirée et on dénombre les colonies le lendemain matin. Le principal avantage de cette technique est de fournir des résultats en 18 heures alors que la NCBP demande 48 heures. On a essayé d'opérer directement sur des petits volumes de lait non dilué, mais une étude comparative récente a montré que la méthode requiert de nouvelles mises au point avant de pouvoir être considérée comme une méthode type d'examen bactériologique du lait.

*Technique des bandes Bacto.* Cette technique a été conçue en Suisse (Forg, 1956), pour l'exécution de contrôles bactériologiques quand on manque de laboratoire. On peut se procurer des bandes Bacto pour la numération bactérienne totale, le comptage des levures et moisissures et le dénombrement des coliformes; des bandes spéciales ont été conçues pour le contrôle des contaminations de surface (Johns & Berzins, 1957). Les bandes sont faites de papier-filtre fort, stérile, imprégné d'un milieu de culture spécifique choisi en fonction de la numération souhaitée. De la taille de la bande dépend la quantité d'échantillon absorbée (1 ml ou 0,1 ml).

Pour exécuter le test, on retire la bande de son enveloppe plastique scellée, on la plonge un instant dans le lait à éprouver, on l'égoutte et on la réintroduit dans son enveloppe avant de la mettre à incuber. La portion supérieure, qui peut avoir été contaminée par la manipulation, est déchirée au niveau des perforations et jetée. Le bout ouvert de l'enveloppe en plastique est placé entre deux lames de verre et soudé par exposition des bords de verre à une flamme. Après incubation à 37°C pendant 8-10 heures, on dénombre les colonies apparues. La méthode est considérée comme un procédé d'orientation satisfaisant, mais pas encore comme un moyen de contrôle. D'autre part, elle est coûteuse.

#### *Autres méthodes spéciales*

Les techniques d'examen bactériologique exposées ci-dessus, outre qu'elles sont applicables pour obtenir la numération bactérienne totale, permettent, sous réserve de légères modifications du milieu (addition de substances inhibitrices) ou de la température et du temps d'incubation, de se renseigner sur certains types de micro-organismes. Comme on l'a déjà indiqué, la qualité du produit final dépend de la qualité du produit cru, de l'efficacité du traitement et des conditions d'emballage et de distribution. Il faut donc connaître la qualité bactériologique du lait tout au long des opérations de production.

*Examen microscopique.* Cet examen n'est généralement pas jugé satisfaisant pour déterminer la qualité du lait pasteurisé, parce que les bactéries qui ont subi un traitement thermique se colorent mal et qu'il est très difficile de faire une numération microscopique précise sur un échantillon peu pollué. Il permet toutefois d'être fixé très rapidement sur la qualité générale du lait et décèle infailliblement les échantillons mal traités.

L'application de cette méthode au lait pasteurisé peut même révéler si le lait cru traité était très pollué, s'il contenait un nombre excessif de leucocytes (signe de mammites chez l'animal producteur), si des fautes ont été commises pendant le traitement (détection d'un grand nombre de bactéries) et s'il y a eu multiplication microbienne après la pasteurisation. Quand on pratique l'examen microscopique d'un lait pasteurisé, il ne faut pas oublier que la précision de la méthode est d'autant plus grande que le lait est plus pollué et qu'elle diminue progressivement quand la contamination bactérienne décroît.

*Recherche des germes thermorésistants.* Si la NCBP des produits pasteurisés donne constamment des résultats élevés, il convient de déterminer systématiquement la cause de la pollution. Habituellement, on commence par vérifier l'état bactériologique des arrivages de lait cru. On en soumet des échantillons à la pasteurisation en laboratoire dans les mêmes conditions de température et de durée qu'à l'usine. Les échantillons sont ensuite cultivés par une des méthodes précitées (NCBP, tube ovale, tube roulant ou membrane filtrante). Si la numération de ces échantillons reste élevée, on peut craindre une contamination des approvisionnements laitiers par des organismes thermorésistants. Il s'impose alors d'étudier séparément les livraisons de chaque producteur. Une fois découverte la ferme coupable, on y observe le plus souvent de mauvaises pratiques de nettoyage et un manque d'hygiène. Un nettoyage minutieux de cette ferme, des instructions à l'exploitant concernant le lavage et l'assainissement du matériel de traite et des ustensiles laitiers obtiennent généralement l'amélioration souhaitée. Parfois, on constate que la contamination provient d'un mauvais entretien des camions-citernes; ceux-ci doivent donc être soumis à des contrôles biologiques. Mais il arrive aussi que la numération des échantillons de lait cru après pasteurisation au laboratoire soit satisfaisante. Dans ce cas, c'est que des micro-organismes thermorésistants et thermophiles se sont développés dans l'installation de pasteurisation du centre. Il faut alors contrôler celle-ci par sondage pour savoir où et à quel moment se produit la pollution. Généralement on observe un mauvais nettoyage et une désinfection insuffisante de l'équipement, une médiocre installation des conduites (présence de tuyaux borgnes et d'angles morts), un service trop prolongé des pasteurisateurs entre les nettoyages, l'utilisation de lait de retour ou d'autres produits précédemment pasteurisés, l'accumulation de mousse dans les pasteurisateurs, etc... La mise en pratique de méthodes de nettoyage et d'assainissement satisfaisantes rétablit le plus souvent la situation.

*Recherche des germes thermophiles.* On identifie ces germes par incubation en boîte de Pétri, en tube ovale ou en tube roulant à 55°C. Ils cultivent à cette température et sont ensuite faciles à dénombrer. L'examen microscopique d'étalements de lait pasteurisé peut aussi donner de bons résultats; la présence de gros bacilles azurophiles suggère la présence de bactéries thermophiles.

*Recherche des germes sporulants.* Généralement, qui dit micro-organismes thermorésistants, en parlant de la pollution du lait, pense aux microcoques et microbactéries. En fait, ce sont les bactéries sporulantes qui sont les véritables germes thermorésistants et, en de rares occasions, elles ont été à l'origine de numérations bactériennes élevées dans des produits pasteurisés. Ces organismes sporulants peuvent aussi provoquer la dégradation du lait pasteurisé, qui devient alors putride. On trouve des bactéries sporulantes dans le sol, les poussières, les grains, etc.; elles contaminent facilement le lait cru quand on n'adopte pas à la ferme des pratiques laitières et des méthodes d'hygiène satisfaisantes.

Pour déceler les germes sporulants, il suffit de chauffer le lait à 80°C pendant 10 minutes afin de détruire toutes les cellules végétatives, puis de l'incuber à 35°C environ pendant 72 heures. La présence de bactéries sporulantes se traduit par la formation d'un caillé mousseux. On peut détecter de la même façon les germes anaérobies sporulants en ajoutant du Vaspar (mélange de paraffine et de gelée de pétrole) dans les tubes stériles avant d'introduire l'échantillon et de chauffer. La présence de ces germes dans le lait est nuisible et révèle un état poussiéreux dans la ferme productrice.

*Recherche des coliformes.* Si cette recherche est positive sur des produits négatifs à l'épreuve de la phosphatase et, par conséquent, bien pasteurisés, il faut recourir au sondage en différents points de l'exploitation. Le foyer de contamination est mis en évidence par les nombreuses colonies qui apparaissent sur les préparations. Fréquemment, la contamination se produit pendant l'embouteillage; elle peut être due à la chute de gouttes d'eau de condensation dans le lait. On résout le problème en prévoyant des déflecteurs de condensation et en traitant fréquemment l'extérieur du bol de la remplisseuse par des pulvérisations chlorées. Souvent aussi, la pollution provient d'un matériel mal lavé et mal désinfecté, en particulier des bouteilles. On ne saurait trop souligner que le nettoyage et l'assainissement de tous les ustensiles et de l'installation sont indispensables pour obtenir des produits de haute qualité (Glenn & Olson, 1959).

*Recherche des bactéries responsables du «lait filant».* Il arrive, rarement toutefois, que le lait pasteurisé devienne «filant». Cet état est dû à des germes qui synthétisent un matériau visqueux, capsulaire, s'étirant en fils. Cette dégradation est considérée comme inoffensive mais inesthétique. L'organisme le plus fréquemment en cause (*Alcaligenes viscosus*) se trouve dans l'eau, les aliments du bétail, le sol, le fumier et les ustensiles laitiers; il peut ainsi contaminer les productions fermières. Sauf si la contamination est excessive, les germes sont détruits par la pasteurisation. Le lait filant résulte donc habituellement d'une contamination post-pasteurisation.

Burke et al. (1955) ont signalé que ce défaut peut être causé par un très petit nombre de germes (moins d'un par millilitre). Ils ont mis au point une épreuve qui permet de déceler de 2 à 20 germes par 10 ml de lait en

48 heures : on ajoute à l'échantillon de lait 20 $\mu$ g de pénicilline par millilitre ; on fait incuber à 21°C pendant 24 heures et on ensemence, avec une anse portant 0,01 ml de l'échantillon incubé, une gélose glucosée tryptonée additionnée de 20 $\mu$ g de pénicilline/ml ; on incube la culture à 21°C pendant 24 heures et finalement, à l'aide d'une aiguille, on recherche s'il y a des colonies filamenteuses. Cette épreuve s'est révélée satisfaisante pour déceler plusieurs types de germes qui rendent le lait «filant».

*Test d'incubation préliminaire.* Le refroidissement rapide et suffisant du lait destiné à la pasteurisation est préconisé depuis des années pour obtenir un produit à faible numération bactérienne. Mais l'avènement de la manipulation en vrac du lait de ferme et l'utilisation de cuves de refroidissement en vrac qui permettent d'obtenir beaucoup plus facilement de faibles numérations bactériennes risquent de favoriser les négligences dans l'application des méthodes de production. Tel est particulièrement le cas dans les régions où l'on utilise des tests de réduction d'un colorant pour garder le lait, car, sous l'influence de la réfrigération, les bactéries sont en sommeil et la réduction des colorants peut se trouver anormalement différée. La multiplication bactérienne étant inhibée par le refroidissement, s'il est suffisant, il faut disposer d'une technique qui permette de déceler le manque d'hygiène à la production.

Johns (1958) a proposé un test d'incubation préliminaire qui permet de détecter les défauts de production, même si le test de réduction d'un colorant est satisfaisant. Il consiste à pré-incuber le lait à 12,8°C pendant 18 heures, puis à faire une NCBP ou une épreuve de réduction d'un colorant. Les échantillons dont la qualité bactériologique diminue nettement ont été produits dans de mauvaises conditions sanitaires. Johns recommande vivement l'adoption de ce test d'incubation préliminaire dans les contrôles de qualité.

#### **Conservabilité du produit final**

La manipulation en vrac du lait cru, le refroidissement mécanique du lait et l'amélioration des opérations de lavage et d'assainissement à la ferme ainsi que l'utilisation de traitements de pasteurisation plus poussés que ne l'exige la destruction des organismes pathogènes, ont permis à l'industrie laitière d'obtenir des produits de conservabilité accrue et de population bactérienne très faible. Dans bien des cas, le lait pasteurisé est pratiquement exempt de ferments lactiques, si bien que, conservé aux températures normales d'un réfrigérateur, il ne tourne pas ; il subit cependant certaines altérations qui lui donnent une odeur et un goût putrides car en l'absence de ferments lactiques les bactéries sporulantes et les germes psychrophiles Gram négatifs peuvent se multiplier assez vite et le rendre impropre à la consommation.

Le problème des contrôles de laboratoire destinés à prévoir la conservabilité ou la durée de conservation des produits pasteurisés est particulièrement

complexe. Nombre de tests ont été proposés par divers chercheurs mais aucun d'eux n'est entièrement satisfaisant et ne permet d'évaluer convenablement la conservabilité d'un produit. Comme on l'a déjà mentionné, le type de dégradation le plus fréquent aujourd'hui est dû aux bactéries qui se multiplient à basse température; il n'apparaît qu'après plusieurs jours de conservation au réfrigérateur. Le problème se trouve encore compliqué par le fait qu'après pasteurisation et conditionnement le produit contient un nombre si faible de micro-organismes que ceux-ci ne peuvent pas être décelés par les techniques classiques de culture en boîtes de Pétri. De plus, les *Standard Methods* imposent pour la numération des psychrophiles 7 à 10 jours d'incubation à 5°C, si bien qu'une fois les résultats connus, le produit peut déjà être devenu invendable. Aussi, les chercheurs s'efforcent-ils de trouver un test de laboratoire simple et rapide, qui fournirait une évaluation sûre de la conservabilité probable du produit.

#### *Test de réduction d'un colorant*

Nombre de tests chimiques et physiques: épreuve de stabilité des protéines, modification de la distribution de l'azote, variations de pH, produits de dégradation des protéines et réduction du lactose ont été proposés et essayés, mais les changements étaient trop faibles, trop inconstants et avaient lieu, dans le temps, trop près des altérations d'arôme pour être utiles. Day & Doan (1956) ont proposé un test de réduction d'un colorant qui, selon eux, est simple et révèle le manque de conservabilité d'un lait pasteurisé réfrigéré. Ce test repose sur la réduction du néotétrazolium par les bactéries dans des conditions déterminées. Le critère de positivité est l'apparition d'une coloration rose après 4 heures d'incubation à 37°C. Ce résultat obtenu sur du lait en bouteille après trois jours au moins de conservation au réfrigérateur laisse prévoir une altération en 3-4 jours.

Dans l'examen critique de leur méthode, Day & Doan, écrivent:

«Peut-être la manière la plus simple d'utiliser ce test, dans le laboratoire d'un centre laitier, consisterait-elle à déterminer d'abord le nombre maximal de jours pendant lesquels le produit serait probablement conservé avant consommation. Ce temps serait pris comme période de conservation, précédant l'exécution de l'épreuve. Un test négatif à ce moment pourrait être jugé satisfaisant, car il indiquerait une conservation supérieure d'au moins 3 jours à celle qui est absolument indispensable.»

Ce test de conservabilité est intéressant, mais il convient de noter qu'il doit être précédé d'une période d'incubation de trois jours et que son exécution exige une verrerie et un équipement spéciaux.

Un autre test de réduction d'un colorant a été récemment proposé par Broitman, Mallman & Trout (1958). Il est fondé sur le changement de coloration du triphényl-2,3,5 tétrazolium dans le lait pasteurisé, après incubation à 20°C.

La composition de la solution spéciale du colorant à utiliser est la suivante :

Chlorure de triphényl-2,3,5 tétrazolium (CTT) . . . . .	0,1 g
Nacconol NR ST . . . . .	1,0 g
$K_2HPO_4$ . . . . .	5,0 g
$KH_2PO_4$ . . . . .	0,1 g
Eau distillée . . . . .	100 ml

Cette solution est mise dans un flacon de verre fumé, autoclavée à 121°C pendant 15 minutes et conservée dans l'obscurité à la température du laboratoire. On verse aseptiquement 1 ml de la solution dans un tube à essai stérile, on ajoute 10 ml de lait, on mélange bien et on met à incuber. Les observations ont lieu après 12, 24, 36 et 48 heures d'incubation. S'il apparaît une coloration allant du rose pâle au rose soutenu le test est positif.

Broitman et ses collègues déclarent qu'ils ont obtenu de cette façon des résultats satisfaisants et proposent l'interprétation suivante :

Test négatif à 24 h: conservabilité bonne

Test positif à 12 h: conservabilité très médiocre; en moyenne, 4 jours à 4,5°C

Test positif à 24 h: conservabilité médiocre; en moyenne, 9 jours à 4,5°C

Test positif à 36 h: conservabilité bonne; en moyenne, 12 jours à 4,5°C

Test positif à 48 h: conservabilité très bonne; en moyenne, 15 jours à 4,5°C

#### *Numérations en boîtes de Pétri*

Il est reconnu que la numération des psychrophiles (après 7 jours d'incubation à 5°C) dans le lait récemment pasteurisé n'offre qu'un intérêt limité car ces germes peuvent ne se trouver primitivement qu'en très petit nombre — moins de 1/ml — et se développer si vite qu'en quelques jours le lait se gâte. Plusieurs méthodes ont été proposées pour déceler rapidement de très faibles quantités de psychrophiles.

*Incubation de l'échantillon avant ensemencement.* Bien que la numération des psychrophiles se fasse en principe après 7 jours d'incubation à 5°C, consécutifs à l'ensemencement, il convient de noter que tous les psychrophiles importants du point de vue laitier cultivent aussi et poussent rapidement entre 21° et 25°C. On peut donc incuber à ces températures pour les déceler. On a trouvé avantageux, lorsque les psychrophiles sont si peu nombreux qu'on n'en trouve pas dans un échantillon de 1 ml, d'incuber l'échantillon à 21°-25°C pendant 18-20 heures avant l'ensemencement. Cette méthode ne conduit évidemment pas à une numération exacte mais permet de savoir s'il y a des germes psychrophiles dans l'échantillon. Il convient d'ajouter que les germes ne peuvent être considérés comme des psychrophiles importants, du point de vue laitier, que si la formation de colonies typiques et le dégagement d'une odeur caractéristique sont observés sur les cultures.

Galesloot (1955) considère que l'incubation préliminaire des échantillons est une technique d'identification satisfaisante de la contamination post-pasteurisation. Il propose une incubation à 15°C pendant 24 heures pour

décélérer les psychrophiles et à 20°C pendant 48 heures, ou à 27°C pendant 24 heures, pour mettre en évidence les streptocoques non thermorésistants.

Le problème de la conservabilité du lait pasteurisé varie selon les régions. Dans certaines zones, le lait est conservé au réfrigérateur depuis le moment du traitement jusqu'à celui de la consommation. Dans d'autres, les ménagères ne disposent généralement pas de l'installation nécessaire; il faut alors que l'exploitant du centre laitier sache combien de temps son produit restera marchand.

Une revue de la littérature à ce sujet montre que la plupart des chercheurs sont d'accord pour considérer que la numération bactérienne totale, le dénombrement des coliformes et les tests de réduction effectués sur le produit aussitôt après le traitement n'ont guère de valeur lorsqu'il s'agit de prévoir la conservabilité du lait dans les conditions qui règnent au foyer du consommateur. Tous les chercheurs estiment que pour être véritablement utiles, les tests de conservabilité doivent être exécutés sur des échantillons préalablement maintenus à 17°C pendant 24 heures.

Provan & Rowland (1949) ont suggéré que les tests de réduction permettraient une mesure directe de la conservabilité à condition que les échantillons soient préalablement incubés à 18°C pendant 18 à 24 heures. La conservabilité des échantillons qui à 37°C ne réduisent pas le bleu de méthylène ou la résazurine en 30 minutes est supérieure à un jour à 18°C.

Beterlsen, Mattsson & Dufeu (1956) ont recommandé que les coliformes soient dénombrés d'abord immédiatement après le traitement et de nouveau après 24 heures d'incubation à 17°C. Pour être bien conservable, le lait pasteurisé ne doit pas contenir plus de 100 coliformes par millilitre après cette incubation. Ces auteurs considèrent que le temps de réduction d'un colorant dans du lait incubé à 17°C pendant 24 heures doit excéder 5 heures pour garantir une conservabilité de 48 heures à 17°C.

Berger & Anderson (1949) ont proposé que, lorsqu'il s'agit de déceler une contamination après traitement, les échantillons prélevés par sondage dans le circuit de distribution ne soient testés qu'après incubation à 17°C pendant 24 heures. On procède alors à des numérations bactériennes totales, à des dénombrements de coliformes et à des tests de réduction tant sur ces échantillons que sur le produit fini.

*Méthode de la membrane filtrante.* Des variantes de cette méthode ont été proposées, permettant le passage de 5 à 10 ml d'un échantillon à travers le filtre et la collecte de tous les micro-organismes. L'incubation de la membrane sur un milieu convenable à 21°-25°C pourrait donner une numération assez exacte des psychrophiles. Ces variantes bénéficient de la mise au point des membranes DA, signalée par Fifield et al. (1957) dans leurs études sur la numération des coliformes par la méthode en question.

*Milieus de culture spéciaux.* Il a également été proposé d'ajouter de faibles doses de pénicilline au milieu de culture et d'incuber à 21°-25°C pendant 2-3 jours.

Cette méthode s'est révélée tout à fait satisfaisante pour la détection des psychrophiles dans le fromage blanc.

Bien que les méthodes précitées permettent une numération plus rapide des psychrophiles que celles qui sont décrites dans les *Standard Methods*, on manque de données pour établir une corrélation entre la détection précoce d'un petit nombre de germes et la dégradation ultérieure du produit.

#### BIBLIOGRAPHIE

- American Public Health Association (1960) *Standard methods for the examination of dairy products*, 11<sup>e</sup> éd., New York
- Barber, F. W. (1942) *Amer. Butter Rev.*, juin, 206
- Barber, F. W. & Frazier, W. C. (1943) *J. Dairy Sci.*, **25**, 285
- Berger, G. & Anderson, L. (1949) In: *Proc. XII Int. Dairy Congr.*, Stockholm, **3**, 366
- Bertelsen, E., Mattsson, N. & Dufeu, J. (1956) In: *Proc. XIV Int. Dairy Congr.*, **3**, 316
- Broitman, S., Mallmann, W. L. & Trout, G. M. (1958) *J. Milk Tech.*, **21**, 284
- Burgwald, L. H. (1942) *J. Dairy Sci.*, **25**, 285
- Burke, C. P., Fram, H. & Barber, F. W. (1955) In: New York State Association of Milk Sanitarians, *Twenty-ninth annual report*, New York, 45
- Cole, C. C. (1955) *Food Processing*, **16**, N° 7, 54
- Committee on Applied Laboratory Methods (1956) *J. Milk Tech.*, **19**, 13
- Day, E. A. & Doan, F. J. (1956) *J. Milk Tech.*, **19**, 63
- Elliker, P. R. (1949) *Practical dairy bacteriology*, New York, McGraw-Hill
- Fay, A. C. (1939) *Milk Plant Monthly*, **28**, 25
- Fifield, C. W., Hoff, J. E. & Proctor, B. F. (1957) *J. Dairy Sci.*, **40**, 588
- Forg, F. J. (1956) *Lab. Pract.*, **5**, 439
- Foster, E. M., Nelson, F. E., Speck, M. L., Doetsch, R. N. & Olson, J. C. (1957) *Dairy microbiology*, Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall
- Fram, H. (1957a) *J. Dairy Sci.*, **40**, 19
- Fram, H. (1957b) *J. Dairy Sci.*, **40**, 1649
- Galesloot, T. E. (1955) *Ned. Melk- en Zuivel-T.*, **9**, 227
- Gilcreas, F. W. & Davis, W. S. (1940) *J. Milk Tech.*, **3**, 14
- Glenn, W. E. & Olson, H. C. (1959) *Milk Dealer*, **48**, N° 6, 54
- Goetz, A. & Tsuneishi, N. (1951) *J. Amer. Wat. Wks Ass.*, **43**, 943
- Hammer, B. W. & Olson, H. C. (1941) *J. Milk Tech.*, **4**, 83
- Johns, C. K. (1953) In: *Proc. XIII Int. Dairy Congr.*, La Haye, **2**, 241
- Johns, C. K. (1955) *Canad. Dairy J.*, **34**, N° 1, 35
- Johns, C. K. (1958) *Canad. J. publ. Hlth*, **49**, 339
- Johns, C. K. & Berzins, I. (1957) *J. Milk Tech.*, **20**, 345
- Kästli, P. (1957) *Dairy Sci. Abstr.* **19**, 784
- Kay, H. D. & Graham, W. R., jr. (1935) *J. Dairy Res.*, **6**, 191
- Myers, R. P. & Pence, J. A. (1941) *J. Milk Tech.*, **4**, 18
- Provan, A. L. & Rowlands, A. R. (1941) In: *Proc. XII Int. Dairy Congr.*, Stockholm, **2**, 586
- Sanders, G. P. & Sager, O. S. (1948) *J. Dairy Sci.*, **31**, 845
- Sharer, H. (1953) *J. Milk Tech.*, **16**, 86
- Thomas, B. F., Clegg, L. F. L., Hobson, P. M. & Thomas, S. B. (1952) *Lab. Pract.*, **1**, 111
- Thomas, S. B. (1958) *Dairy Sci. Abstr.*, **20**, 356, 448
- Wright, R. C. & Tramer, J. (1953a) *J. Dairy Res.*, **20**, 177
- Wright, R. C. & Tramer, J. (1953b) *J. Dairy Res.*, **20**, 258
- Wright, R. C. & Tramer, J. (1954) *J. Dairy Res.*, **21**, 37