RECHERCHE D'UN MILIEU DE CULTURE APPROPRIÉ A LA BACTÉRIOLOGIE FROMAGÈRE

Travail de l'Institut des Recherches Agronomiques (Station régionale
de Recherches laitières de Poligny.)

par

G. GUITTONNEAU

Directeur du Laboratoire national des Industries laitières

P. SAJOUS

et

R. DE PEET

Directeur de la Station régionale de
Recherches laitières et de l'Ecole
d'Industrie laitière de Poligny

Préparateur à la Station
de Poligny

(Fin)

III. — ETUDE DES MILIEUX GELOSÉS A BASE DE LAIT ÉCRÉMÉ DIGÉRÉ PAR LA PEPSINE (1)

La pepsine laisse la matière albuminoïde intacte lorsqu'elle agit en milieu neutre. On sait que l'effet optimum est obtenu en présence de quelques milligrèmes d'acide chlorhydrique, mais que beaucoup d'autres acides peuvent remplacer l'acide chlorhydrique, et notamment, l'acide lactique. Cet acide se produisant normalement au cours de la préparation des fromages, nous avons pensé qu'il était intéressant d'examiner son action concurremment avec celle de l'acide chlorhydrique.

DUCLAUX (2) a indiqué, d'après PETIT, que la dose optima d'acide (pour la digestion de la fibrine) est de 2 à 5 millièmes pour l'acide chlorhydrique et de 20 millièmes pour l'acide lactique.

Ces chiffres nous ont servi de base pour nos essais. Ceux-ci ont porté, comme d'habitude, sur l'action d'une solution stérile de la diastase, et exceptionnellement sur l'action d'une poudre pepsique non stérile.

A. — INFLUENCE SUR LA DIGESTION PEPSIQUE DE L'ACIDITÉ DU MILIEU A L'ORIGINE

La pepsine commerciale dont nous disposions étant peu soluble dans l'eau nous n'avons pu préparer de solution dont la concentration dépassât 1‰. Il fallait donc ajouter 1.000 cc. de cette solution à 1.000 cc. de lait pour observer l'action de 1 gramme de pepsine. Nous ne pouvions dépasser cette dose sous menace de trop diluer le milieu et de ne pas atteindre en fin d'expérience la concentration de 1,8‰ d'azote soluble que nous voulions obtenir.

Nous en tenant donc à cette dose de pepsine, nous avons mis

(1) Pepsine en paillettes Rhône-Poulenc.

(2) DUCLAUX : Traité de microbiologie, tome II, Diastases, Toxines et Vaccins, p. 655.

TABLEAU IV

DIGESTION PEPSIQUE DU LAIT ÉCRÉMÉ

(Analyses effectuées après 10 jours de digestion 38°)

N ^{os} des milieux	Addition à 1.000 cc. de lait			Volume final en cc. du liquide soumis à la digestion	Acidité initiale de 1.000 cc. de liquide	Analyse chimique du liquide de digestion				Chiffres rapportés à 1.000 cc. de lait écrémé		
	Solution de pepsine à 1 %	HCl 1 cc. = 0. gr 44 HCl	Acide lactique			Acidité (cc. soude N/10 pour 10 cc.)	Azote total en gr. ‰	Azote des acides aminés titrable au formol en gr. ‰	Azote ammoniacal en gr. ‰	Azote total en gr.	Azote des acides aminés titrable au formol en gr.	Azote ammoniacal en gr.
1	1000 cc.	10 cc.		2010	2,2	6,3	2,45	0,102	0,098	4,92	0,205	0,197
2	1000 cc.	20 cc.		2020	4,3	12	2,45	0,130	0,136	4,95	0,263	0,274
3	1000 cc.	40 cc.		2040	8,6	23,5	2,48	0,140	0,196	5,06	0,285	0,399
4	1000 cc.		200 cc, (sol. à 10%)	2200	9,1	12,3	2,27	0,118	0,050	4,99	0,260	0,110
5	1000 cc.		50 cc, (à 25° B)	2050	21	26,8	2,34	0,146	0,050	4,79	0,300	0,102

Composition du lait écrémé d'expérience	Acidité	1 cc. 7 soude N/10 pour 10 cc.
	Lactose	50.85 gr. par litre.
	Azote total	5.75 »
	Azote titrable au formol..	0.085 »
	Azote ammoniacal	0.037 »

en évidence l'influence de l'acidité du milieu à l'origine par l'expérience IV.

EXPÉRIENCE IV. — Dans cette expérience l'acide chlorhydrique et l'acide lactique ont été ajoutés au lait écrémé déjà additionné de pepsine (1 gr. par litre) dans les proportions qu'indique le tableau IV, de manière à obtenir une concentration par litre de liquide à digérer de 2 gr. 2, 4 gr. 3 et 8 gr. 6 de Hcl d'une part et, d'autre part, de 9 gr. 1 et 21 gr. d'acide lactique. Les flacons ont été maintenus à l'étuve à 38°.

Dans ces milieux acides, il s'est formé, surtout avec l'acide chlorhydrique, un coagulum très fin, léger, floconneux, qui n'a pas disparu totalement au bout de dix jours, bien que l'attaque ait commencé à se manifester dès le premier jour. A partir de 4 %, l'acide chlorhydrique a donné une coloration grisâtre tandis qu'avec l'acide lactique, la couleur est restée jaune clair.

La peptonisation de la caséine n'a pas été très rapide et elle n'a paru suffisante qu'au bout de huit à dix jours.

Les résultats d'analyse inscrits dans le tableau IV s'appliquent à des digestions de dix jours.

Interprétation des résultats de l'expérience IV. — En examinant les chiffres du tableau IV, on peut voir que l'acide lactique permet une solubilisation de la caséine tout à fait comparable à celle qu'on obtient en présence de l'acide chlorhydrique, avec, toutefois, une production un peu moindre d'acides aminés et d'ammoniaque. Quant à l'azote total, considéré par rapport à 1.000 cc. de lait, il est très voisin de 5 gr. dans tous les essais (sauf le dernier), alors que le lait dosait 5 gr. 75 d'azote total. L'azote total des liquides digérés, filtrés, représente donc seulement 87 % de l'azote total du lait.

EXPÉRIENCE IV bis. — Afin de vérifier si une digestion poussée plus loin était capable de modifier de façon sensible la composition du milieu, nous avons préparé en double les flacons 2 et 5 et, tandis que les premiers étaient analysés au bout de dix jours (tableau IV), les seconds ont été maintenus 25 jours à l'étuve avant d'être analysés. Les résultats obtenus à l'analyse sont reproduits dans le tableau IV bis. Ils montrent seulement une très légère augmentation de l'azote soluble total, ainsi que de l'azote des acides aminés et de l'azote ammoniacal. Ces modifications peu sensibles ne justifient pas une digestion aussi prolongée pour la préparation d'un milieu bactériologique d'application courante.

B. — ESSAI DE DIGESTION PAR UNE POUDRE PEPSIQUE NON PRIVÉE DE GERMES

Nous avons vu que le volume de solution pepsique employé dans nos essais était égal à celui du lait à digérer. La filtration à la bougie

TABLEAU IV bis

DIGESTION PEPSIQUE DU LAIT ÉCRÉMÉ

(Analyse après 25 j. de digestion à 38°)

Nos des milieux (1)	Acidité initiale de 1.000 cc. de liquide	Analyse chimique du liquide de digestion			Chiffres rapportés à 1.000 cc. de lait écrémé		
		Azote total en gr. ‰	Azote des acides aminés titrable au formol en gr. ‰	Azote ammoniacal en gr. ‰	Azote total en gr.	Azote des acides aminés titrable au formol en gr.	Azote ammoniacal en gr.
2	4,3 gr. HCl	2,55	0,140	0,154	5,15	0,283	0,311
5	21 gr. acide lactique	2,41	0,145	0,065	4,94	0,297	0,133

(1) Les milieux 2 et 5 sont les mêmes que les milieux 2 et 5 du tableau IV.

d'un volume aussi important de cette solution est nécessairement un peu longue. Considérant d'autre part que, par suite de leur forte acidité, les milieux en cours de digestion pouvaient sans doute se défendre contre l'invasion des germes microbiens contenus dans la poudre de pepsine, nous avons ajouté directement ces poudres au lait écrémé à digérer dans l'expérience V.

EXPÉRIENCE V. — En dehors de cette différence, l'expérience V a été conduite exactement comme l'expérience IV. La quantité de pepsine employée était également de 1 gramme par litre de lait, mais cette addition étant faite sous forme de poudre, le lait n'était ici dilué que par les solutions acides qu'il recevait, c'est-à-dire très peu. Les résultats des analyses effectuées, au bout de dix jours de digestion, sont consignés dans le tableau V. Pour comparer les expériences IV et V il faut évidemment examiner ceux des chiffres des tableaux IV et V qui sont rapportés à 1.000 cc. de lait (3 dernières colonnes). Cette comparaison montrera qu'à acidité correspondante les chiffres qui expriment les 3 formes d'azote dosées, sont, dans leur ensemble, comparables dans les deux cas étudiés.

**C. — ESSAIS DE NUMÉRATION SUR LES MILIEUX GÉLOSÉS
A BASE DE LAIT ÉCRÉMÉ DIGÉRÉ PAR LA PEPSINE**

EXPÉRIENCE VI. — Des milieux gélosés ont été préparés avec chacun des 9 milieux obtenus (voir tableaux IV et V) dans les conditions précédemment indiquées et ces milieux ont été essayés au point de vue de leur valeur nutritive suivant la technique générale adoptée pour tous nos essais. Les résultats des numérations ainsi effectuées figurent dans le tableau VI.

TABLEAU V

DIGESTION DU LAIT ÉCRÉMÉ PAR UNE POUDRE PEPSIQUE NON STÉRILE

(Analyses effectuées après 10 jours de digestion à 38°)

N° des milieux	Addition à 1.000 cc. de lait			Volume final en cc. du liquide soumis à la digestion	Acidité initiale de 1.000 cc. de liquide	Analyse chimique du liquide de digestion				Chiffres rapportés à 1.000 cc. de lait écrémé		
	Pepsine en poudre	Acide chlorhydrique 1 cc. = 0 gr. 44 HCl	Acide lactique			Acidité (cc. soude N/10 pour 10 cc.)	Azote total en gr. ‰	Azote des acides aminés titrable au formol en gr. ‰	Azote ammoniacal en gr. ‰	Azote total en gr.	Azote des acides aminés titrable au formol en gr.	Azote ammoniacal en gr.
6	1 gr.	9 cc.		1010	4 } gr.	12,2	4,87	0,238	0,168	4,92	0,240	0,169
7		20 cc.		1020	8,8 } HCl	24,7	5,01	0,266	0,378	5,11	0,270	0,385
8			100 cc.									
8			(sol. à 10%)	1100	9 } gr.	13,4	4,31	0,196	0,126	4,74	0,216	0,138
9	1 gr.	25 cc.										
9			(à 25° B)	1025	21 } acide lactique	29,9	5,02	0,266	0,126	5,14	0,273	0,129

La composition du lait écrémé est celle indiquée au bas du Tableau IV.

TABLEAU VI

ESSAIS DE NUMÉRATION SUR DIVERS MILIEUX GÉLOSÉS A BASE

DE LAIT ÉCRÉMÉ DIGÉRÉ PAR LA PEPSINE

(Température d'incubation : 30°. Comptage des colonies le 5^e jour)

N ^{os} des milieux	Nombres de colonies développées après ensemencement par 1 cc. d'une dilution de lait à $\frac{1}{10000}$			Nombres de colonies rapportés à 100 comptés sur le milieu 1			Moyenne (chiffres des 3 dernières colonies)
	essais			essais			
	1	2	3	1	2	3	
1	207	204	159	100	100	100	100
2	182	193	143	87	94	90	90
3	177	201	141	85	98	89	91
4	191	206	143	92	101	90	94
5	4	0	5	2	0	3	2
6	116	124	80	56	61	50	56
7	102	92	55	49	45	35	43
8	157	130	121	75	64	76	72
9	112	90	73	54	42	46	47

Interprétations des résultats rassemblés dans le tableau VI. — Le milieu N^o 1 apparaissant nettement comme le meilleur, c'est lui qui a été pris comme terme de comparaison.

Il est à remarquer que le milieu N^o 5 est tout à fait défavorable au développement des germes. Comme le milieu N^o 9, il avait reçu à l'origine 21 grammes d'acide lactique par litre de liquide mis en digestion. Mais le milieu N^o 9 a été dilué fortement pour ramener sa richesse en azote à 1,8 % et son acidité s'est trouvée de ce fait très diminuée. Le milieu N^o 5, au contraire, a été peu dilué pour être ramené à la richesse en azote de 1,8 ‰ (il renfermait 2 gr. 34 d'azote) et après cette légère dilution son acidité restait considérable. Après neutralisation, il contenait donc une dose élevée de sels de soude et ceux-ci ont évidemment gêné le développement de beaucoup de microorganismes.

Les milieux 1-2-3-4 donnent des résultats assez voisins les uns des autres, mais les milieux 2 et 3 étaient un peu trop foncés pour permettre un comptage facile des colonies. Les milieux N^o 1 et N^o 5 qui donnaient d'ailleurs le nombre le plus élevé de colonies, étaient au contraire de couleur jaune clair et se prêtaient bien aux numérations.

D. — CONCLUSION DE NOTRE ÉTUDE SUR LES MILIEUX LAIT ÉCRÉMÉ-PEPSINE

On peut donc obtenir assez facilement avec la pepsine des milieux gélosés clairs. La comparaison de ces divers milieux nous a montré

que c'étaient les N° 1 (à 2 gr. 2 % de Hcl) et N° 4 (à 9 gr. % d'acide lactique), l'un et l'autre préparés en partant d'une solution pepsique stérile — mais qu'on pourrait à la rigueur obtenir en partant directement de poudres pepsiques non stériles — qui ont les plus grandes valeurs nutritives.

Nous prendrons le N° 1, qui arrive en tête, comme milieu-type *lait écrémé-pepsine*, de préférence au N° 4, en considération du fait que la neutralisation n'introduit dans le milieu N° 1 qu'une petite quantité de Nacl, constituant normal du lait et des fromages ; pendant que dans le milieu N° 4 elle introduit des doses relativement importantes de lactate de soude.

Rappelons donc le mode de préparation de ce milieu type N° 1 :

Ajouter à un litre de lait écrémé stérilisé 1.000 cc. d'une solution pepsique stérile à 1 %, puis 10 cc. d'acide chlorhydrique concentré. Maintenir à l'étuve à 38° C en agitant 2 ou 3 fois par jour. Au bout de 10 jours porter 15 minutes à 120° pour clarifier et détruire la diastase, filtrer, ramener à une très faible acidité et diluer jusqu'à teneur en azote de 1,8 %, géloser à 16 %, ajuster à pH 6,8-6,9, clarifier par chauffage à 115° et filtration, répartir en tubes stériles et porter 10 minutes à 110-112°. (Pour les détails voir p. 7 et 9.)

IV. — ETUDE DES MILIEUX GELOSÉS A BASE DE LAIT ÉCRÉMÉ DIGÉRÉ PAR LA PRÉSURE (1)

La coagulation du lait par les extraits de présure commerciaux se produit sans aucune addition d'acide. Mais l'action solubilisatrice que ces présures exercent sur la caséine est favorisée par une certaine acidité.

Nous avons choisi comme acide adjuvant l'acide lactique parce que c'est celui qui se produit normalement au cours de la préparation des fromages, notamment pendant l'égouttage, et que c'est en présence de cet acide, que la présure restant dans le caillé peut manifester son action peptonisante. Nous avons étudié simultanément, en groupant les essais en plusieurs séries parallèles, l'influence de quantités croissantes de diastase et d'acide.

A. — INFLUENCE DE LA DOSE DE PRÉSURE ET DE L'ACIDITÉ A L'ORIGINE

EXPÉRIENCE VII. — Le dispositif adopté dans cette expérience a été le suivant : Cinq séries d'essais ont été préparés avec des doses croissantes de présure :

Série I :	0 cc. 2	de présure par litre de lait (	4 cc.	présure à 5 %)
» II :	1 cc.	»	»	(20 cc. » à 5 %)
» III :	5 cc.	»	»	(100 cc. » à 5 %)

(1) Extrait liquide de présure Fabre.

Série IV : 10 cc.	»	»	(50 cc. présure à 20%)
» V : 20 cc.	»	»	(100 cc. » à 20%)

Dans chaque série, on a préparé 5 flacons : un premier flacon sans addition d'acide et les 4 autres avec des doses croissantes d'acide lactique en solution stérile à 100 gr. par litre de manière que l'acide lactique incorporé à 1.000 cc. du liquide mis en digestion, fut de 2 gr. 5, 5 gr.-10 gr. et 15 gr. Dans les 3 premières séries on a ajouté de l'eau stérile pour arriver à un même volume de 1.200 cc., ce qui était plus commode pour les observations et les calculs. La présure employée avait une force de 8.500 et dosait 5 gr. 75 d'azote par litre. Une correction a été faite pour tenir compte de l'azote soluble apporté par la présure.

La digestion a été arrêtée, comme pour la pepsine, au bout de 10 jours. Ce temps était nécessaire pour qu'elle fût suffisamment avancée dans tous les flacons.

Le tableau VII indique les quantités de présure et d'acide lactique employées pour chaque essai, et les observations faites au cours de la digestion. Le tableau VII *bis* indique les résultats de l'analyse chimique des liquides de digestion.

OBSERVATIONS RELATIVES A L'EXPÉRIENCE VII. — a) *Coagulation et digestion du lait.* — Dans les flacons N° 1 de chaque série qui n'avaient pas reçu d'acide, le coagulum a été *très* lent à se former surtout avec les doses faibles de présure (par suite du chauffage préalable du lait) et la digestion a été peu active. Au bout de 10 jours, c'est dans ces flacons N° 1 que le coagulum occupait le plus grand volume. Les flacons N° 2 de chaque série (2 gr. 5 acide lactique) ont donné un coagulum fortement rétracté dans le fond du flacon ; ce coagulum s'est désagrégé peu à peu. C'est dans ces flacons N° 2, à 2 gr. 5 d'acide lactique, que le volume de coagulum était le plus réduit en fin d'expérience. Pour les doses plus fortes d'acide, le coagulum occupait une plus grande hauteur, mais il était plus léger et floconneux.

A l'encontre de ce qui se passe dans les digestions tryptiques où la solubilisation de la caséine est pour ainsi dire totale, il y a toujours avec la présure une certaine partie de caillé qui reste inattaquée. Mais dans les digestions par la présure on a noté que, comme dans les autres digestions diastasiques, les acides aminés et l'azote ammoniacal augmentent parallèlement à l'azote solubilisé.

b) *Influence de l'acidité sur la digestion.* — Dans notre expérience VII, nous avons nettement vérifié que l'acidification du milieu est indispensable à une solubilisation rapide de la caséine par la présure. En ajoutant au lait de 2 gr. 5 à 5‰ d'acide lactique nous arrivions au seuil de la zone des acidités les plus favorable à l'action des diastases protéolytiques contenues dans nos extraits de présure. Cette zone

TABEAU VII.
DIGESTION DU LAIT ÉCRÉMÉ PAR LA PRÉSURE

Séries	N°	Pour 1.000 cc. de lait écrémé			Volume final en cc. du liquide soumis à la digestion	Acide lactique en gr. ‰ du liquide	Observations sur la coagulation au bout de 3 heures
		Présure à 5 ‰	Ac. lact. à 10 ‰	Eau stérile			
I	1	4 cc.	0 cc.	196 cc.	1200	0	non coagulé – grumeaux au bout de 24 h.
	2	4	30	166	1200	2,5	coag. rétracté au fond
	3	4	60	136	1200	5	coag. = 7/10(1)
	4	4	120	76	1200	10	coag. = 9/10
	5	4	180	16	1200	15	coag. = 9/10
II	6	20 cc.	0 cc.	180 cc.	1200	0	non coagulé, coagulé au bout de 24 h.
	7	20	30	150	1200	2,5	coag. rétracté au fond
	8	20	60	120	1200	5	coag. = 6/10
	9	20	120	60	1200	10	coag. = 9/10
	10	20	180	0	1200	15	coag. = 9/10
III	11	100 cc.	0 cc.	100 cc.	1200	0	coagulé en masse
	12	100	30	70	1200	2,5	coag. rétracté au fond
	13	100	60	40	1200	5	coag. = 5/10
	14	100	122	0	1222	10	coag. = 6/10
	15	100	195	0	1295	15	coag. = 7.5/10
IV	16	Présure à 20% 50 cc.	0 cc.	50	1100	0	coagulé en masse
	17	50	27.5	22.5	1100	2,5	coag. rétracté au fond
	18	50	55	0	1105	5	coag. = 4/10
	19	50	116	0	1166	10	coag. = 5/10
	20	50	185	0	1235	15	coag. = 5/10
V	21	100 cc.	0 cc.	0 cc.	1100	0	coagulé en masse
	22	100	30	0	1130	2,5	coag. rétracté au fond
	23	100	58	0	1158	5	coag. = 3,5/10
	24	100	120	0	1220	10	coag. = 4/10
	25	100	194	0	1294	15	coag. = 4/10

(1) Cette annotation signifie que la hauteur du coagulum représente les 7/10 de la hauteur du liquide à l'origine. Même remarque pour les rapports suivants.

TABLEAU VII bis.

DONNÉES ANALYTIQUES SUR LES LAITS DIGÉRÉS PAR LA PRÉSURE

Nos des milieux	Analyse chimique du liquide de digestion				Chiffres rapportés à 1.000 cc. de lait écrémé			Observations
	Acidité (cc. soude N/10 pour 10 cc.)	Azote total en gr. ‰	Azote des acides aminés titrable au formol en gr. ‰	Azote ammoniacal en gr. ‰	Azote total en gr.	Azote des acides aminés titrable au formol en gr.	Azote ammoniacal en gr.	
1	1,6	0,70	0,020	0,052	0,84	0,025	0,062	Contaminé
2	»	»	»	»	»	»	»	
3	6,4	1,68	0,030	0,078	2,10	0,036	0,094	
4	12,4	1,75	0,060	0,074	2,10	0,072	0,088	
5	16,4	2,07	0,070	0,104	2,48	0,084	0,125	
6	1,5	1,25	0,090	0,054	1,50	0,108	0,065	
7	4,9	1,99	0,100	0,060	2,39	0,126	0,072	
8	7,1	2,93	0,150	0,058	3,51	0,180	0,070	
9	13	2,93	0,205	0,061	3,51	0,246	0,073	
10	16,7	3,00	0,240	0,065	3,60	0,288	0,078	
11	1,4	1,47	0,110	0,072	1,76	0,132	0,086	
12	5,3	3,65	0,250	0,079	4,38	0,300	0,083	
13	7,9	3,61	0,235	0,073	4,33	0,282	0,087	
14	13,9	3,41	0,170	0,152	4,16	0,204	0,186	
15	20,4	3,24	0,182	0,126	4,21	0,237	0,163	
16	»	»	»	»	»	»	»	Contaminé
17	»	»	»	»	»	»	»	
18	8,2	4,26	0,300	0,077	4,68	0,330	0,085	Contaminé
19	14,5	3,84	0,253	0,083	4,45	0,297	0,097	
20	21,5	4,19	0,305	0,073	5,15	0,375	0,090	
21	»	»	»	»	»	»	»	Contaminé
22	»	»	»	»	»	»	»	
23	9,2	4,28	0,325	0,095	4,96	0,377	0,110	Contaminé
24	14,8	3,93	0,266	0,098	4,79	0,324	0,119	
25	21,1	3,51	0,270	0,081	4,56	0,351	0,105	

Composition du lait écrémé d'expérience	{	Acidité.....	1 cc. 7 soude N/10 pour 10 cc.
		Lactose	50 gr. 85 par litre,
		Azote total	5 gr. 75 »
		Azote titrable au formol.	0 gr. 085 »
		Azote ammoniacal	0 gr. 037 »

s'étendait assez loin dans le sens des acidités croissantes puisqu'une addition au lait de 15‰ d'acide lactique agissait sensiblement comme une addition de 5‰.

c) *Influence de la quantité de présure sur la digestion.* — Comme il était facile de le prévoir la proportion d'azote solubilisé a augmenté d'une façon constante avec la quantité de présure ajoutée (sauf pour le N° 25), dans chacune des séries de nos essais.

d) *Influences combinées de l'acidité et de la dose de présure employée.* — Le tableau VIII (extrait du tableau VII bis) permet de se rendre compte : 1° que l'azote solubilisé augmente pour une même dose de présure quand le milieu devient acide (lignes horizontales) mais qu'à partir de 5‰, cette augmentation n'est plus guère sensible ; 2° que pour une même acidité, l'azote solubilisé augmente avec la dose de présure (colonnes verticales).

TABLEAU VIII

DIGESTION DU LAIT ÉCRÉMÉ PAR LA PRÉSURE

INFLUENCES COMBINÉES DE LA DOSE DE PRÉSURE ET DE L'ACIDITÉ INITIALE

Quantité de présure pour 1.000 cc. de lait en cc.	Grammes d'azote total soluble pour 1.000 cc. des liquides de digestion acidifiés par des doses d'acide lactique de :				
	0 ‰	2,5 ‰	5 ‰	10 ‰	15 ‰
0,2	0,84	»	2,01	2,10	2,48
1	1,50	2,39	3,51	3,51	3,60
5	1,76	4,38	4,33	4,16	4,21
10	»	»	4,68	4,45	5,15
20	»	»	4,96	4,79	4,56

Les quantités d'azote des milieux contaminés ne figurent pas dans le tableau.

L'examen des chiffres du tableau VIII montre en outre que, pour une même acidité, la quantité d'azote solubilisée n'est pas proportionnelle à la dose de présure employée. Le graphique A où les quantités de présure ont été portées en abscisses et les quantités d'azote solubilisé au bout de 10 jours en ordonnées, montre plus clairement encore que l'influence de la dose de présure sur la solubilisation de l'azote est bien accusée jusqu'à la dose de 5‰, et beaucoup moins sensible avec des doses supérieures.

B. — ÉSSAIS DE NUMÉRATIONS SUR LES MILIEUX A BASE DE LAIT ÉCRÉMÉ DIGÉRÉ PAR LA PRÉSURE

Les essais ont été réalisés comme dans les cas précédents.

EXPÉRIENCE VIII. — Des milieux gélosés ont été préparés avec 12 milieux différents (voir tableaux VII et VII bis) qui sont indiqués en

en même temps que les résultats qu'ils ont donnés aux essais de numérations dans le tableau IX.

GRAPHIQUE A

Interprétation des résultats rassemblés dans le tableau IX. Les milieux 20-24-25, plus foncés que les autres, ont en outre donné des colonies plus petites.

Les meilleurs milieux ont été les N^{cs} 12 et 13. Quatre nouveaux

TABLEAU IX

ESSAIS DE NUMÉRATION SUR DIFFÉRENTS MILIEUX A BASE DE LAIT ÉCRÉMÉ
DIGÉRÉ PAR LA PRÉSURE

Numéros des milieux	Nombres de colonies développées après ensemencement par 1 cc. d'une dilution de lait à $\frac{1}{10.000}$			Nombres de colonies rapportées à 100 comptées sur le milieu 12			Moyenne (chiffres des 3 der- nières colonnes)
	essais			essais			
	1	2	3	1	2	3	
	1	2	3	1	2	3	
4	130	62	»	51	45	»	»
7	184	85	81	72	60	69	67
9	136	72	68	53	52	58	54
12	260	138	118	100	100	100	100
13	242	128	103	94	92	87	91
14	164	78	67	64	56	57	59
15	165	87	63	64	62	53	53
18	212	106	100	83	76	85	81
19	204	93	90	80	67	76	74
20	104	57	57	40	41	48	46
24	166	76	60	65	55	51	57
25	195	103	77	76	74	65	72

essais répétés sur ces deux milieux préparés indépendamment des précédents nous ont donné aux épreuves de numération les nombres suivants de colonies :

Avec le N° 12 : 173 - 95 - 91 - 194

Avec le N° 13 : 150 - 59 - 82 - 182

Il ressort donc nettement de ces essais que le milieu N° 12 est le meilleur au point de vue du développement des colonies microbiennes.

C. — CONCLUSION DE L'ÉTUDE DES MILIEUX GÉLOSÉS A BASE DE LAIT ÉCRÉMÉ-PRÉSURE

Cette étude nous a permis, tout en recherchant le meilleur milieu à base de lait écrémé digéré par la présure, de nous rendre compte de l'allure de la digestion du lait en présence de des doses variables de présure et d'acide lactique, et de chiffrer l'action favorable de ce dernier dans les conditions de nos expériences.

En ce qui concerne le choix d'un milieu nutritif nous concluons par l'adoption comme milieu-type *lait écrémé-présure* du milieu N° 12 dont nous rappelons ci-après la préparation :

A un litre de lait écrémé stérilisé, ajouter 100 cc. d'une dilution stérile d'extrait de présure (force 10.000) à 5 % et 30 cc. d'une solution stérile d'acide lactique à 100 gr. par litre. Maintenir à l'étuve à 38° C. en agitant

2 ou 3 fois par jour. Au bout de 10 jours, porter 15 minutes à 120° pour détruire les diastases et clarifier, ramener à une très faible acidité et diluer jusqu'à une teneur en azote de 1,8‰. Gélifier à 16‰, ajuster à pH 6, 8, 6,9, clarifier par chauffage à 115° et filtration, répartir en tubes stériles et porter 10 minutes à 110-112°. (Pour les détails, voir p. 7 et 9.)

V. — COMPARAISON DES TROIS MILIEUX GELOSÉS TYPES : LAIT ÉCRÉMÉ-TRYPSINE, LAIT ÉCRÉMÉ-PEPSINE, LAIT ÉCRÉMÉ-PRÉSURE

Poursuivant le plan de recherches que nous nous étions tracé, il nous restait, après avoir déterminé les trois meilleurs milieux-types : lait écrémé-trypsine, lait écrémé-pepsine, lait écrémé-présure, à confronter les résultats que donneraient chacun d'eux dans une dernière épreuve de numération où il serait fait usage, pour l'ensemencement, d'un même lait.

EXPÉRIENCE IX. — Pour obtenir nos trois milieux-types à éprouver nous sommes partis d'un même lait écrémé stérilisé dont nous avons soumis 3 échantillons à l'action digestive des 3 diastases dans les conditions antérieurement indiquées comme étant les plus favorables.

Après digestion les liquides ont été analysés et les résultats obtenus, rassemblés dans le tableau X, montrent que c'est la trypsine qui a le plus énergiquement attaqué la caséine en libérant la plus forte proportion d'aides aminés.

TABLEAU X
SOLUBILISATION DE L'AZOTE DANS UN MEME LAIT ÉCRÉMÉ
par
LA TRYPSINE — LA PEPSINE — LA PRÉSURE

Nature de la diastase	Volume final en cc. du liquide soumis à la digestion	Analyse chimique du liquide de digestion					Chiffres rapportés à 1.000 cc. de lait		
		pH	Acidité (cc. soude N/10 pour 10 cc.)	Azote total en gr. ‰	Azote des acides aminés titrable au formol en gr. ‰	Azote ammoniacal en gr. ‰	Azote total en gr.	Azote des acides aminés titrable au formol en gr.	Azote ammoniacal en gr.
Trypsine	1200	5,3	4,8	4,58	0,720	0,283	5,49	0,864	0,333
Pepsine	2010	»	6,3	2,60	0,147	0,119	5,23	0,295	0,233
Présure	1200	5	5,3	3,90	0,225	0,128	4,68	0,270	0,153

Composition du lait écrémé d'expérience	<div></div>	Acidité.....	1 cc. 9 soude N/10 pour 10 cc.
		Azote total.....	5,72 gr. par litre.
		Azote titrable au formol..	0,095 »
		Azote ammoniacal	0,072 »

Les milieux gélosés préparés suivant les indications antérieurement fournies ont donné à l'épreuve de numération les résultats qu'on trouvera consignés dans le tableau XI. Ces résultats font nettement apparaître la supériorité du milieu *lait écrémé-trypsine* que suit de près cependant le milieu *lait écrémé-présure*.

TABLEAU XI

ESSAIS COMPARATIFS DE NUMÉRATIONS SUR LES TROIS MEILLEURS
MILIEUX-TYPES : LAIT ÉCRÉMÉ-TRYPSINE, LAIT ÉCRÉMÉ-PEPSINE,
LAIT ÉCRÉMÉ-PRÉSURE

Numéros des essais	Nombres de colonies développées après ensemencement par 1cc. d'une dilution de lait à $\frac{1}{10.000}$			Nombres de colonies rapportés à 100 comptées sur le milieu Lait écrémé-Trypsine		
	Lait écrémé Trypsine	Lait écrémé Pepsine	Laitécrémé Présure	Lait écrémé Trypsine	Lait écrémé Pepsine	Lait écrémé Présure
1	126	85	118	100	68	94
2	108	100	115	»	93	106
3	71	53	69	»	74	97
4	101	83	85	»	82	84
5	92	60	78	»	67	85
6	98		86	»		88
7	58		48	»		83
8	163		157	»		96
9	88		90	»		102
10	55		42	»		76
11	134		130	»		97
12	129		114	»		88
Nombre moyen de colonies pour chaque milieu (moyenne des nombres figurant dans chaque colonne)				100	77	91

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans le cadre des études que nous avons entreprises et que nous venons de résumer, notre milieu gélosé type lait écrémé-trypsine s'est finalement montré supérieur à tous les autres milieux de nature analogue auxquels nous l'avons comparé. Cela suffisait pour que nous l'adoptions au cours de nos recherches de bactériologie fromagère.

Sa préparation (1) est d'ailleurs simple et économique :

Elle est *simple* du fait que les digestions tryptiques du lait écrémé sont rapides et faciles à conduire au laboratoire.

Elle est *économique* puisque un litre de lait écrémé soumis à l'action

(1) Voir p. 618.

de un gramme de trypsine commerciale fournit, après dilution et filtrations, plus de deux litres de liquide nutritif à un prix de revient très inférieur à celui des solutions peptonées couramment employées en bactériologie (1).

Ce milieu nous semble donc intéressant à plus d'un titre. Ayant à le faire connaître, nous espérons avoir fourni aux chercheurs dont il retiendra l'attention assez de documents pour qu'ils puissent apprécier sa valeur.

LA GRAISSE DU SANG ET LA GRAISSE DU LAIT PENDANT LA LACTATION

par

Ch. PORCHER

et

L. MAYNARD

Docteur ès-Sciences physiques.

Professeur de Nutrition des animaux
Université Cornell, Ithaca (N. Y.).

(Fin.)

Depuis les recherches faites au laboratoire de l'Ecole Vétérinaire de Lyon, nous avons à citer le travail de l'un de nous, L. A. MAYNARD, en collaboration avec C. M. McCAY, et enfin, une étude toute récente de J. MARCQ, déjà cités l'un et l'autre.

« Depuis quelques années, dit J. MARCQ, on s'efforce, dans plusieurs instituts zootechniques, de mettre au point des données certaines sur la composition chimique et biologique du sang en relation avec la constitution et la productivité des animaux. Les recherches ont porté sur le dosage de la substance sèche du sang, sa teneur en hémoglobine, le nombre de globules rouges et blancs, y compris les variétés de ces derniers, l'alcalinité du sang, les phénomènes d'isoagglutination, etc. Il faut bien reconnaître que, jusqu'à présent tout au moins, on n'a pu dégager de conclusions vraiment applicables à la pratique. Il s'agit d'ailleurs d'épreuves délicates dont les résultats peuvent être au surplus influencés par de multiples facteurs ambiants. »

« Il est pourtant raisonnable de persévérer dans cette voie. On aura rendu un grand service à l'éleveur le jour où l'on pourra lui dire : « Parmi les jeunes taureaux d'élevage que vous possédez, celui-ci est certainement le plus intéressant quant à ses possibilités beurrières. » Semblable raisonnement peut être applicable aux jeunes femelles. De ce point de vue, nous avons pensé que le dosage de la matière grasse du sang, du « taux butyreux sanguin », suivant une

(1) A Poligny, le litre de ce liquide nous revient actuellement à moins de deux francs, tandis qu'un liquide peptoné à 2 % nous coûte 7 francs le litre environ.