et fait bouillir pour chasser l'excès de brome jusqu'à ce que le volume soit réduit à 1-1,5 cm. On refroidit, ajoute quelques milligrammes d'iodure de potassium, puis une goutte d'une solution fraîchement préparée d'amidon soluble et titre en utilisant une pipette identique à celle employée pour mesurer le chloroforme et une solution N/250 d'hyposulfite de sodium. Comme chaque molécule d'acide iodique libère 6 atomes d'iode, on obtiendra donc 6 fois la quantité d'iode présente.

Le titre de la solution d'hyposulfite est déterminé chaque fois en faisant un essai à blanc avec une quantité connue d'iode, à peu près égale à celle à déterminer.

SUR LES FLORES BACTÉRIENNE ET FONGIQUE DES CAILLÉS DE LAIT

RÔLE DES SYMBIOSES DANS LA MATURATION DU CAMEMBERT

par

Mademoiselle FRANÇOISE SANSONETTI

Docteur en Pharmacie

(Suite)

TROISIÈME PARTIE

EFFETS DE L'ACTIVITÉ DES ORGANISMES SUR LE MILIEU

Cette Partie est réservée à l'étude des transformations du milieu par le *Penicillium*, l'*Odium*, les ferments lactiques et leurs symbioses. Nous examinerons d'abord l'action des organismes sur la réaction du milieu et sur les sucres. Nous étudierons ensuite l'effet des diastases, et quelques aspects de l'attaque de la caséine.

1. — ACTION SUR LA RÉACTION DU MILIEU

A du sérum d'emprésurage, nous avons ajouté des indicateurs : 15 % de teinture de tournesol, ou des colorants de l'échelle des pH de CLARK et LUBS, en qualité indiquée par les auteurs.

La zone de virage des indicateurs employés s'étendait depuis $pH = 3,0$ à $pH = 9,6$. Ces colorants n'avaient aucun effet toxique sur les cultures ; mais celles-ci, modifiant le rouge de méthyle, toute variation comprise entre $pH = 4,4$ et $pH = 6$ passait inaperçue. Aussi dans une troisième expérience les indicateurs ont été supprimés. Le pH des cultures a été pris régulièrement suivant la technique habituelle de CLARK et LUBS.

Conditions des cultures. — Les milieux stérilisés à 115° pendant 1/4 d'heure sontensemencés et portés à l'étuve à 24° .

Action du *Penicillium*. — Cette moisissure acidifie d'abord le milieu qui passe de $pH = 6$ à $pH = 5,8$ (Fig. 5). Il atteint ensuite $pH = 4,8$ le 6^e jour et s'y maintient jusqu'au 11^e jour. Le milieu se neutralise ensuite progressivement, puis brusquement, devient alcalin avec $pH = 8,8$ le 20^e jour. Le *Penicillium* acidifie d'abord les milieux, puis les alcalinise.

Action de l'*Oïdium*. — Le milieu devient immédiatement et très rapidement alcalin avec l'*Oïdium*. Avec un milieu de pH initial = 5,2 nous avons obtenu $pH = 9$ le 8^e jour. L'alcalinisation peut être encore plus rapide (voir la courbe de l'alcalinisation des milieux par l'*Oïdium*) (Fig. 5). Le milieu de $pH = 6$ passe le 5^e jour à $pH = 8$ et atteint $pH = 9$ le 7^e jour.

Fig. 5. — Variations du pH des cultures de *Penicillium* (—), *Oïdium* (-----), ferments lactiques du rouge (.....), bactéries du défaut de salage (— . .), symbiose *Penicillium* + *Oïdium* (— — — —).

D'après ces expériences, l'*Oïdium* apparaît comme un organisme alcalinisant. RULLMANN [121] affirmant que l'*Oïdium* acidifie le lait stérile, nous avons tenu à contrôler sur ce même milieu les propriétés alcalinisantes de notre souche d'*Oïdium*.

Dosage de NH^3 formé par l'*Oïdium* dans le lait

Du lait réparti en fioles d'Erlenmeyer, par portions de 10 cm³, a été stérilisé à 115° pendant 1/4 d'heure (cultures à 24°). NH^3 est dosé par le procédé de SCHLÆSING. On déplace NH^3 à l'aide du lait de chaux ; l'alcali se combine à une

quantité connue de SO^4H^2 titré. On dose par la soude SO^4H^2 resté libre. Quelques dosages sont d'abord effectués sur du lait stérile.

Le laitensemencé d'*Oidium* dégage une quantité de NH^3 équivalente à 0 cc. 15 de SO^4H^2 N/10, le 3^e jour.

Le 5^e jour, NH^3 formé correspond à 0 cm³ 85 de SO^4H^2 N/10. Notre souche d'*Oidium* alcalinise donc le lait stérile. En ajoutant au caillé des colorants du pH (4 cm³ de colorant pour 10 gr. de caillé) on peut s'assurer que *l'Oidium alcalinise immédiatement le caillé stérile comme tous les autres milieux ; il s'oppose ainsi au Penicillium qui acidifie d'abord les milieux et ne les alcalinise que tardivement* (Fig. 5).

Action des ferments lactiques. — Le milieu s'acidifie et passe de pH = 6,04 à pH = 5,3 le 6^e jour. Le 11^e jour, pH = 5,1 ; le milieu atteint pH = 4,6 le 20^e jour seulement. *Les ferments lactiques du rouge sont donc faiblement acidifiants, ce qui confirme l'attaque très lente du lactose par ces bactéries.*

Action des bactéries prélevées sur un fromage insuffisamment salé. — Le milieu présente très rapidement une réaction alcaline. La teinture de tournesol est décolorée dès le 3^e jour ; aucun des autres organismes n'attaque cet indicateur. Dès le 2^e jour les cultures passent de pH = 6 à pH = 7,4 ; elles atteignent pH = 9 le 5^e jour. Ces bactéries sont donc nettement alcalinisantes.

Action des symbioses. — Les symbioses alcalinisent les milieux rapidement sous l'influence de l'*Oidium* ; mais dès que le *Penicillium* se développe, l'alcalinisation devient très lente ; parfois même, ainsi que l'indique la courbe de la symbiose *Penicillium* + *Oidium*, le milieu redevient acide (Fig. 5).

Des faits de même ordre semblent se reproduire dans les fromages. Du 2^e au 5^e jour, l'acidité diminue, le pH passe de 4,3 à 6,2. Mais, *dès que le Penicillium se développe, la tendance à l'alcalinisation subit un brusque arrêt ; le pH semble demeurer presque constant ; du 5^e au 12^e jour il passe à peine de 6,2 à 6,5.* Il semble bien que, pendant cette période, l'acidification due au *Penicillium* s'oppose à l'alcalinisation déterminée par l'*Oidium*, et que ces réactions de sens contraire s'annulent. Si le *Penicillium* prédominait sur l'*Oidium*, l'acidité de la pâte pourrait même augmenter ; MESNIL [105] a précisément constaté une forte acidité, au moment où le *Penicillium* atteint son développement maximum. *Les fromages insuffisamment salés ne portant pas de Penicillium, s'alcalinisent très rapidement, pH = 8,5 le 12^e jour au lieu de pH = 6,5 pour les fromages bien salés couverts de Penicillium et d'Oidium.*

L'*Oidium*, en alcalinisant le caillé, prépare le terrain au développement des bactéries : ces bactéries sont alcalinisantes en l'absence de *Penicillium*. Ce sont au contraire des ferments lactiques du « rouge »,

résistant à l'acidité, qui prédominent sur un fromage recouvert à la fois d'*Oidium* et de *Penicillium*.

Par la réaction qu'elles déterminent, les Moisissures sélectionnent donc la flore bactérienne des fromages.

ROLE DU pH INITIAL SUR LA RÉACTION DÉTERMINÉE PAR LES MOISSURES

Nous avons recherché si l'*Oidium* et le *Penicillium* se comportent d'une façon identique dans des milieux de réaction acide ou de réaction alcaline.

Les Moisissures ont été ensemencées sur du petit-lait ajusté aux pH suivants : 6,4 — 7,2 — 8 — 8,3 (stérilisation et conditions de culture identiques à celles des expériences précédentes). Le *Penicillium acidifie indifféremment les milieux de réaction acide ou alcaline*. Le milieu de $pH = 6,4$ passe à $pH = 5,8$ le 4^e jour. En milieu alcalin, le pH varie de 7,2 à 6,2 le 8^e jour. Le milieu de pH initial, égal à 8, atteint 6 le 5^e jour.

L'*Oidium alcalinise avec une très grande rapidité les milieux acides*. Les phénomènes sont tout autres en milieu alcalin où l'*Oidium acidifie* toujours les cultures ; le pH passe de 8 à 6,8. Mais, fait essentiel à remarquer, cette acidification est de très courte durée ; après 24 h. le milieu s'alcalinise et atteint $pH = 8,4$.

Fig. 6

Variations
du pH en milieux acides

Variations
du pH en milieu alcalin

Penicillium (—), *Oidium* (---)

Avec les milieux ajustés à $pH = 7,2$ et $pH = 8,3$ l'acidification déterminée par l'*Oidium* se maintient quelques jours (Fig. 6).

Le *Penicillium acidifie* donc tous les milieux quel que soit leur pH initial. L'*Oidium* est au contraire un alcalinisant énergique ; mais, sur

des milieux de pH alcalin, une acidification de très courte durée précède l'alcalinisation.

Les variations du pH du caillé dépendront donc :

1° *De la nature de la flore* : L'*Oïdium* et les bactéries du défaut de salage sont alcalinisants ; les ferments lactiques et le *Penicillium* acidifient le milieu ; ce dernier amène secondairement une réaction alcaline ;

2° *Du pH du milieu* : Le sens et la vitesse de ces changements de réaction sont parfois fonction du pH initial du milieu.

RAPPORT ENTRE LA CONSOMMATION DU SUCRE ET LA RÉACTION DU MILIEU

Dans différentes expériences, nous avons cherché à suivre la relation entre l'attaque du lactose par les organismes et le pH des cultures. Du liquide de SABOURAUD, lactosé à 5 % et réparti par portions de 20 cm³ dans des fioles d'Erlenmeyer, a été stérilisé à 115° pendant 1/4 d'heure. Des ensemencements très larges à l'aide de véritables boutures de Moisissures activent le développement du *Penicillium* toujours très lent en milieu liquide. Sur les cultures maintenues à 24°, on fait les déterminations suivantes :

1° *Réaction du milieu* : recherche du pH d'après la méthode de CLARK et LUBS ;

2° *Dosage du lactose consommé* d'après la méthode de BERTRAND :

On recueille la totalité du milieu de culture en décantant au préalable le mycélium sur un petit entonnoir garni de deux filtres tarés et superposés. Afin de recueillir toutes les traces de sucre on lave à l'eau distillée le mycélium et les tubes avec lesquels a été déterminé le pH des cultures. Avec ces eaux de lavage on complète à 200 cm³ le volume du milieu de culture. On effectue le dosage du lactose sur 10 cm³ de cette dilution qui représentent 1 cm³ de milieu primitif. BERTRAND recommande en effet d'opérer le dosage sur 20 cm³ de solution renfermant au plus 90 mg. de sucre. En ajoutant aux 10 cm³ de la dilution 10 cm³ d'eau distillée on se trouve dans les conditions prescrites par l'auteur ;

3° *Pesée des récoltes* : le mycélium lavé est desséché pendant 24 h. à l'étuve à 100°. Après refroidissement dans un dessiccateur, on le pèse.

Consommation du lactose par le *Penicillium*. — Le tableau suivant met en évidence la destruction progressive du lactose par la Moisissure ; parallèlement le milieu s'acidifie et passe de pH = 4,8 à pH = 4,4 (8^e jour). Dès le 15^e jour, le milieu se neutralise ; il passe à l'alcalinité le 18^e jour (pH = 8,8) ; dès lors on ne peut plus déceler dans le milieu la moindre trace de lactose.

Le *Penicillium* apparaît donc comme un gros destructeur de lactose ; l'attaque du sucre détermine l'acidification rapide du milieu ; celui-ci ne passe à l'alcalinité que lorsque tout le lactose a été consommé (Fig. 5).

TABLEAU I. — Cultures du *Penicillium* sur SABOURAUD lactosé

Jours	pH	LACTOSE		RÉCOLTES	OBSERVATIONS
		restant	consommé		
0	4,8	44,5 mg.			
8	4,4	40	4,5 mg.	90 mg.	Une couronne blanche.
9	4,4	26 »	18,5 »	155 »	Ilots blancs. Masses gélatineuses.
10	4,4	21,5 »	23 »	200 »	Presque entièrement couvert. Spores.
15	5,6	6,5 »	38 »	260 »	Epaisse couche mycélienne.
16	6,2	2,7 »	41,8 »	300 »	Mycélium légèrement rosé.
18	8,8	0 »	44,5 »	304 »	id.
30	9	0 »	44,5 »	306 »	id.

Consommation de lactose par l'Oïdium. — Les cultures sur SABOURAUD sont très misérables ; aussi n'en a-t-il pas été tenu compte. L'Oïdium prospérant mieux sur le petit-lait, les cultures sont effectuées sur ce milieu. On élimine par chauffage à feu nu, stérilisation et filtration, les protéines coagulables par la chaleur. La concentration du petit-lait explique sa forte teneur en lactose (77 mg. par centimètre cube).

TABLEAU II. — Cultures d'Oïdium sur petit-lait

Jours	pH	LACTOSE		RÉCOLTES	OBSERVATIONS
		restant	consommé		
0	4,6	77 mg.			
2	6,4	73 »	4 mg.	38,5 mg.	Voile épais.
3	8,4	72 »	5 »	45 »	»
5	8,8	71 »	6 »	92,5 »	»
6	9	67 »	10 »	104,5 »	»
9	9	64 »	13 »	84 »	Voile dissocié.
15	9	63,5 »	13,5 »	74,5 »	»

Après 48 heures de culture, le milieu est déjà partiellement neutralisé ; le pH est passé de 4,6 à 6,4 ; une faible quantité de lactose a été consommée (4 mg.). Le milieu alcalin dès le 3^e jour (pH = 8,4) passe à pH = 8,8 le 5^e jour et atteint pH = 9 le 6^e jour ; il reste encore dans le milieu 67 mg. de lactose par centimètre cube. L'alcalinisation des milieux par l'Oïdium est donc immédiate et n'a aucun rapport avec la teneur en sucre du milieu.

Ce caractère l'oppose au *Penicillium* qui n'alcalinise les milieux que lorsqu'il en a épuisé tout le sucre (Fig. 7).

Fig. 7. Variations du pH en fonction du sucre restant dans le milieu

Penicillium (—). *Oidium* (---)

Consommation du lactose par les symbioses. — Sur des cultures de petit-lait en tous points identiques, nous avons obtenu les résultats suivants le 20^e jour.

Symbiose *Penicillium* + *Oidium* : pH = 6,34 ; lactose restant = 12 mg. par cm³ ;

Oidium : pH = 9 ; lactose restant = 33 mg.

Penicillium : pH = 8,01 ; aucune trace de lactose.

Tandis qu'en culture pure, les Moisissures ont alcalinisé profondément le milieu, en symbiose elles maintiennent le milieu acide (pH = 6,34). Ces faits s'expliquent aisément : le développement du *Penicillium* est limité par l'*Oidium* dans la symbiose ; aussi reste-t-il une réserve de sucre (12 mg.) ; le *Penicillium* en l'utilisant acidifie le milieu.

Action des organismes sur les milieux privés de sucre. —

A 100 cm³ d'eau, on ajoute 2 gr. de peptone et 10 cm³ d'acide lactique N/10. Les milieux sont stérilisés à 115° pendant 1/4 d'heure. Après ensemencement ils sont portés à l'étuve à 24°.

Le *Penicillium*, l'*Oidium* et les ferments lactiques du rouge alcalinisent simultanément les milieux sans sucre. Mais, alors qu'en milieu sucré l'*Oidium* est un alcalinisant énergique et rapide (pH = 9 le 6^e jour), il devient par contre un alcalinisant plus faible en l'absence de sucre (Fig. 8).

Le *Penicillium* alcalinise plus rapidement les milieux que les ferments lactiques du rouge et que l'*Oidium*.

La teneur des fromages en lactose est une question des plus discutées. D'après ORLA-JENSEN, tout le lactose serait transformé en acide

Fig. 8. — Variations du pH des cultures sans sucre

Penicillium (—)

Oidium (— — —), ferments lactiques du rouge (· · · · ·)

lactique après quelques jours de fabrication ; pour d'autres, le fromage mûr renfermerait du lactose non attaqué. Cette question présente pour le Camembert une particulière importance, car, aussi longtemps que le lactose subsiste, le *Penicillium* et les ferments lactiques du rouge acidifient le milieu.

La durée de neutralisation du caillé dépendra donc tout autant :

1° De l'égouttage et de l'activité de la fermentation lactique qui règlent la teneur de la pâte en lactose ; (tous les organismes alcalinisent le caillé dès que le sucre est épuisé) ;

2° De la flore : même en présence de lactose, l'*Oidium* et les bactéries du défaut de salage alcalinisent le milieu.

DES DIASTASES SÉCRÉTÉES PAR LES ORGANISMES DU CAMEMBERT

La nature et le rôle des ferments sécrétés par les organismes sont des plus variés. Nous nous sommes bornée à rechercher pour les Moisissures et les bactéries lactiques, les ferments oxydants et les ferments réducteurs.

1. — IDENTIFICATION DES OXYDASES ET DES RÉDUCTASES

1° Recherche des oxydases. — Certaines substances telles le naphтол α, le gaïacol, le pyrogallol, le chlorhydrate de naphtylamine α, oxydées par les ferments, changent de teinte. Pour rechercher les ferments oxydants, nous avons ajouté à 10 cm³ de milieu stérile et liquéfié, 1 goutte (mesurée au compte-goutte normal) de solution de gaïacol (0 gr. 50 pour 100 d'eau stérile). Les Moisissures ont été ensemencées sur du milieu de CZAPECK et sur du petit-lait, et les bactéries sur du

milieu de SABOURAUD et du petit-lait. Les cultures ont été effectuées à la fois sur ces milieux de réaction acide et alcaline. Tous nos milieux ont été gélatinés à 15 % et stérilisés à 110° pendant une demi-heure. Après addition de gaïacol les milieux sont solidifiés en position inclinée. Les cultures sont conservées à la température ordinaire.

Le gaïacol retarde de 4 à 5 jours l'apparition des Moisissures ; ensuite le développement est aussi abondant que dans les témoins sans gaïacol. Les ferments lactiques ne subissent aucun retard. Après plus d'un mois de culture, la teinte du milieu n'a pas été modifiée, ce qui ne permet pas de supposer l'élaboration de ferments oxydants par les Moisissures et les ferments lactiques.

2° *Recherche des réductases.* — Elle repose sur la réduction du bleu de méthylène en leucobase incolore. A 5 cm³ de lait on ajoute 1 goutte (mesurée au compte-goutte normal) de solution de bleu de méthylène à 1 %. On stérilise à 115° pendant 1/4 d'heure. Les résultats suivants se rapportent à des cultures maintenues à 24°.

Penicillium. — La décoloration du bleu de méthylène est lente et incomplète ; le 12^e jour le milieu présente une teinte vert de gris correspondant à un produit de réduction intermédiaire : le Vert de Bindschädler (Lutz, 93). Le milieu se recoloré en bleu le 20^e jour. Par la suite, le bleu de méthylène est à nouveau réduit partiellement puis réoxydé.

Oïdium et ferments lactiques du « rouge ». — Ils réduisent très rapidement le bleu de méthylène en leucobase incolore (*Oïdium* 3^e jour ; ferments lactiques 5^e jour). La réoxydation qui s'annonce le 20^e jour est très lente et incomplète.

Les Moisissures et les ferments lactiques élaborent donc des réductions ; mais celles-ci diffèrent entre elles :

1° Par leur activité : la réduction du bleu de méthylène s'opère successivement dans l'ordre décroissant suivant : *Oïdium*, ferments lactiques, *Penicillium*. La réoxydation est d'autant plus rapide dans l'ordre inverse ;

2° Par les produits de réduction : l'*Oïdium* et les ferments lactiques seuls réduisent le bleu de méthylène en leucobase incolore ;

3° Par les produits de réoxydation : seul le *Penicillium* réoxyde complètement le bleu de méthylène.

La réoxydation plus ou moins complète du bleu de méthylène laisse supposer l'intervention de ferments oxydants dans certaines conditions de milieu. Sans doute, doit-on attribuer à ces produits de réduction et d'oxydation, la saveur et le bouquet des fromages. Il semble d'ailleurs qu'une certaine analogie pourrait être établie entre la maturation des fromages et la maturation des vins. Au cours de la vinification, les réductions sont intenses ; les phénomènes d'oxydation semblent intervenir particulièrement dans la formation du bouquet. Mais, des espèces d'organismes nettement déterminées concourent à imprimer aux vins leur bouquet spécifique. Dans les fromages, les réductions et les oxydations dont semble dépendre le bouquet varient profondément avec la

flore. Celle-ci n'étant pas toujours identique à elle-même, il n'est nullement surprenant de constater une certaine variabilité dans les caractères organoleptiques de la pâte.

II. — INFLUENCE DU MILIEU SUR LES RÉDUCTASES

Dans le caillé, les organismes évoluent dans un milieu dont la réaction et la composition sont variables. Nous avons recherché :

1° Si la nature du sucre avait une influence sur la réduction du bleu de méthylène ;

2° Le rôle de la réaction du milieu ;

3° Le rôle du sel.

1° Rôle des sucres : Dans de l'eau peptonée à 2 %, nous avons dissous, séparément, à la dose de 3 %, les sucres suivants : saccharose, glucose, lactose, galactose. A 5 cm³ de milieu, on ajoute 1 goutte de solution à 0 gr. 50 % de bleu de méthylène. Les milieux sont stérilisés à 120° pendant 1/4 d'heure. Cultures à 24°.

La vitesse de réduction du bleu de méthylène dépend de la nature du sucre ; elle est rigoureusement parallèle à l'attaque des sucres par les ferments lactiques et s'effectue dans l'ordre suivant : galactose, glucose, lactose, saccharose.

D'où l'obligation pour nos milieux de choisir comme sucre le lactose, élément énergétique du caillé.

Milieux pour l'étude des facteurs modifiant l'activité des réductases. — Nous avons étudié simultanément l'influence :

1° De la composition du milieu (réaction, teneur en sel) ;

2° De la composition de la flore (symbioses),
sur la réduction du bleu de méthylène par les Moisissures et les ferments lactiques.

Nous indiquerons donc en une seule fois la préparation de tous les milieux :

a) *Le substratum.* Lesensemencements ont été faits :

1° En milieu naturel liquide : petit-lait à la présure débarrassé d'albumine (voir p. 84) ;

2° En milieu artificiel solide : Gélose de SABOURAUD lactosée à 4 % ;

b) *La réaction.* Une partie des milieux était acide : pH = 6, 4, une partie a été alcalinisée et ramenée à pH = 8 ;

c) *Dose de sel.* On ajoute 2 %, 4 %, 6 % de sel ; ce dernier pourcentage n'est jamais atteint dans le Camembert ;

d) *Solution de bleu de méthylène.* A 5 cm³ de milieu, on ajoute 1 goutte (mesurée avec un compte-goutte normal) de solution de bleu de méthylène à 0 gr. 50 % ;

e) *Colorants du pH.* Aux témoins sans sel, ni bleu de méthylène, nous avons ajouté du bromocrésol pour la série acide ; du rouge de phénol pour la série alcaline (quantité de colorant correspondant aux échelles de CLARK et LUBS).

Le SABOURAUD est gélosé à 3 % ; après stérilisation à 115° pendant 1/4 d'heure les géloses sont solidifiées en position verticale.

COMPOSITION DES SÉRIES. — Les milieux liquides aussi bien que solides, de réaction acide ou alcaline, comprennent respectivement 5 séries ainsi composées :

1^{re} Série : milieu seul ou additionné de colorants du pH (milieux liquides) ;

2^e Série : milieu + bleu de méthylène ;

3^e Série : milieu + bleu de méthylène + 2 % NaCl ;

4^e Série : milieu + bleu de méthylène + 4 % NaCl ;

5^e Série : milieu + bleu de méthylène + 6 % NaCl.

Dans chaque série, nous avons cultivé à l'étuve à 24° le *Penicillium*, l'*Oidium* et les ferments lactiques du rouge seuls et en symbiose dans 2 tubes à la fois.

Remarques. — En milieu liquide et alcalin, le *Penicillium* forme d'abord des colonies en anaérobiose ; celles-ci étoilent la paroi du tube où elles se fixent de préférence ; après 5 jours le *Penicillium* forme quelques îlots en surface.

Le bleu de méthylène retarde de 3 à 4 jours le développement des Moisissures et des ferments lactiques ; mais dès qu'ils commencent à proliférer en milieu liquide, ils réduisent toujours le bleu de méthylène en profondeur. La décoloration gagne progressivement la surface.

La réduction du bleu de méthylène est en tous points identique en milieu artificiel (SABOURAUD) et en milieu naturel (petit-lait).

2^o Rôle de la réaction du milieu. — ACTION SUR L'*Oidium* ET LES FERMENTS LACTIQUES. — Aux pH où nous avons opéré la réduction du bleu de méthylène est aussi rapide en milieu alcalin qu'en milieu acide.

ACTION SUR LE *Penicillium*. — La réaction alcaline favorise la réduction du bleu de méthylène qui est presque totale le 8^e jour en milieu solide ; le feutrage est beaucoup plus épais en milieu acide, mais la réduction est plus tardive (15^e jour).

Il en est de même en milieu liquide : le 23^e jour la réduction est nette en milieu alcalin salé ou non salé ; le 30^e jour seulement, elle s'annonce en milieu acide malgré un développement abondant de *Penicillium*.

L'activité des réductases du *Penicillium* n'est donc pas proportionnelle à la masse mycélienne ; un développement très limité en milieu alcalin suffit à réduire le bleu de méthylène ; l'activité des réductases de la Moisissure est donc sous la dépendance étroite du pH du milieu.

Il semble donc que la flore superficielle du caillé en modifiant la réaction peut régler l'intensité des phénomènes diastasiques.

3^o Rôle du sel. — *Oidium* ET FERMENTS LACTIQUES DU ROUGE. — La réduction du bleu de méthylène est d'autant moins rapide que le

salage augmente. Le 8^e jour, en l'absence de sel, l'*Oïdium* a réduit entièrement le bleu de méthylène ; les milieux salés présentent à peine une série de tons verts. Il en est de même pour les ferments lactiques. Le développement limité de ces organismes en milieu salé entraîne, semble-t-il, une réduction moins profonde du bleu de méthylène.

Penicillium. — Les milieux alcalins ne montrent aucune action bien déterminée de NaCl. Le bleu de méthylène est réduit aussi rapidement en milieu salé qu'en milieu non salé.

Dans les milieux solides de réaction acide, le développement du *Penicillium* est très abondant en l'absence de sel ; cependant le bleu de méthylène est intact. Les mycélium sont moins denses en milieu salé, mais le bleu de méthylène est partout réduit. Le 15^e jour, le contraste est encore plus frappant : dans tous les tubes salés sans exception le bleu de méthylène est réduit ; seul le tube sans sel ne montre la moindre réduction. En milieu liquide, les phénomènes sont identiques : en milieu salé la réduction est nette le 20^e jour ; le 30^e jour seulement le milieu sans sel présente une réduction très légère du bleu de méthylène.

Le sel entrave le développement du *Penicillium* ; par contre, il augmente considérablement, en milieu acide, l'activité des ferments réducteurs ; ce phénomène, qui paraît relever de la catalyse, semble de même nature que ceux observés par VAN DAM [138], à savoir que le sel, qui entrave la coagulation, active la digestion de la paracaséine par la chymosine.

Le rôle du sel sur les phénomènes diastasiques est de beaucoup le moins étudié. D'après VAN SLYKE, HARDING et HART le sel retarderait la maturation. Il nous semble cependant qu'étant donné son action activante sur les diastases, il peut intervenir indirectement dans la maturation.

4^e Rôle des symbioses. — D'une façon constante, la réduction du bleu de méthylène est très rapide avec les symbioses. Le 15^e jour de culture, la réduction est incomplète avec les Moisissures, et les ferments lactiques en culture pure. Le bleu de méthylène est entièrement réduit avec la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* ; avec la symbiose *Penicillium* + *Oïdium* + ferments lactiques la décoloration est totale dès le 4^e jour.

En milieu acide ou alcalin, salé ou non salé, les réductases bactériennes et fongiques acquièrent par leur simple juxtaposition une très grande activité.

La réaction du milieu, le salage, les symbioses sont susceptibles de faire varier l'activité des réductases. Dans la pratique fromagère, on ne peut modifier ni la flore du lait ni son acidité ; le salage dont nous avons signalé l'importance est exécuté à la main ; l'égouttage dont dépendra l'acidité de la pâte est déterminé empiriquement. Aussi que de tâtonnements et de subterfuges pour conduire la fermentation !

Ces faits, rapprochés de nos observations, expliquent, dans une certaine mesure, la variabilité de la maturation qu'on observe journellement dans la pratique.

(A suivre.)

MICROBES SAPROPHYTES, MICROBES PATHOGÈNES ET FERMENTS LACTIQUES

APERÇU SUR LA BACTÉRIOTHÉRAPIE LACTIQUE

par le Dr Albert FOURNIER

(Suite)

Toutes les expériences précédentes ont été entreprises prudemment, à *petits pas*, comme nous le disions plus haut. Elles nous ont éclairé sur le sens général des actions réciproques des antagonismes, en un mot sur la concurrence vitale des germes en présence, dans des conditions à peu près équivalentes pour chacune de leurs catégories. Elles ont porté sur des écarts maxima de X gouttes de chacune des cultures en présence. La composition des milieux de ces cultures pouvait donc être dans tous les cas considérée comme négligeable, et c'est ce qui a été prouvé par l'action négative de X gouttes de chaque culture bouillie, dont les microorganismes sont devenus inactifs par l'ébullition. D'autre part, 1 goutte représentant à peu près Occ. 05, X gouttes valent environ 0 cc. 5. C'est pourquoi nous allons répéter les expériences précédentes en utilisant cette fois comme écarts minima, c'est-à-dire X gouttes ou 0,5, les écarts maxima de ces expériences. Nous ferons donc varier maintenant le rapport des volumes des cultures antagonistes en présence, par tranches de 0 cc. 5, en maintenant constante et égale à 2 cc. la somme des deux termes de ce rapport. Bien entendu, nous conserverons les témoins, c'est-à-dire traités dans les mêmes conditions, les milieux de cultures sans microbes (témoignage du zéro), dont la composition ne doit pas varier, ces mêmes milieux successivement ensemencés d'un germe unique à la dose d'1 goutte (contrôle de l'activité du germe éprouvé) et à la dose maxima de 2 cc. Au-dessus de 0 cc. 5, la composition du milieu de culture peut avoir sa part d'action sur le milieu où s'observe l'antagonisme. Minimale sera certainement cette part, puisque le volume ne peut dépasser 2 cc. Elle restera toujours très inférieure à l'action principale des germes vivants qui modifient rapidement la composition du milieu. Elle n'est pourtant pas négligeable, comme nous le verrons quand il s'agit d'un microbe fortement acidogène comme le B dont le milieu de culture primitif est déjà fortement acide.

Les nouvelles expériences ne doublent pas les premières; elles les complètent, non pas seulement parce qu'en effet le milieu de culture primitif peut intervenir par son excès de volume, mais sur-