LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

P. DUMONT et W. DORNER. — La gélose au petit-lait peptoné, milieu de choix pour la détermination du nombre de germes contenus dans le lait	801
G. GUITTONNEAU, P. SAJOUS et DE PEET. — Le nettoyage centrifuge du lait dans la fabrication du fromage de Comté	809
O. LAXA. — La détermination des excréments de la vache dans le lait	816
G. BELLE. — Recherches sur la croissance des mammifères. — Ses relations avec la composition chimique du lait de la mère (<i>Fin</i>)	822
Addendum à l'article de MM. J. PIEN et J. BAISSÉ	833

Bibliographie analytique :

1 ^o Les Livres	833
---------------------------------	-----

2 ^o Journaux, Revues, Sociétés savantes	834
3 ^o Brevets	885

Bulletin bibliographique :

1 ^o Journaux, Revues, Sociétés savantes	887
--	-----

Documents et informations :

A. LEROY. — Le concours de la meilleure vache en 1929	891
Ch. PORCHER et J. BRIGANDO. — Un projet de Congrès de la caséine	900
L'Ouverture prochaine de l'Enseignement supérieur des industries du lait	903
En allant au Congrès de laiterie de Copenhague. — La Réunion de Hambourg	905
Ecole nationale d'Industrie laitière d'Aurillac	908

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

LA GÉLOSE AU PETIT-LAIT PEPTONÉ, MILIEU DE CHOIX POUR LA DÉTERMINATION DU NOMBRE DE GERMES CONTENUS DANS LE LAIT

par P. DEMONT et W. DORNER,

de l'Etablissement fédéral d'industrie laitière et de bactériologie,

LIEBEFELD-BERNE

(Directeur : M. le Prof. Dr R. BURRI).

Depuis quelques années, la détermination de la teneur du lait en bactéries prend une importance croissante, car on considère, de plus en plus, cette teneur comme un des principaux critères pour apprécier la qualité et la fraîcheur du lait. Etant donné les conditions qui régissent la production du lait en Suisse, seule la détermination indirecte de la teneur microbienne par la méthode des cultures entre

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

sérieusement en ligne de compte. De ce fait, le milieu de culture acquiert une grande importance. C'est, en effet, la recherche d'un milieu *ad hoc* qui fait l'objet du présent travail.

Nous nous sommes proposés d'atteindre le but suivant : Trouver un milieu qui soit en même temps bon marché, facile à préparer et éminemment favorable au développement des microbes que l'on rencontre ordinairement dans le lait. Nous n'essayerons même pas de donner une bibliographie quelque peu complète de la question des milieux de culture, cela dépasserait le cadre de notre travail, tant ceux qui ont été proposés sont nombreux.

Pour répondre au premier point de notre proposition, il était évident qu'il nous fallait éliminer d'avance tout milieu qui réclame de la viande comme base de sa préparation, puis éviter l'emploi des peptones coûteuses, comme la peptone Witte, par exemple.

Nous sommes d'abord parvenus à préparer un tel milieu en utilisant les produits de digestions tryptique et pancréatique du sang et du lait écrémé, mais l'exécution de ces digestions nous mettait en contradiction avec le deuxième point de la proposition, point qui spécifie que le milieu doit être facile à préparer. Nous avons dû pour cette raison étendre nos recherches. Celles-ci nous ont conduits finalement à la préparation de la gélose au petit lait dilué peptoné, milieu qui répond parfaitement aux trois conditions énoncées plus haut, et dont nous donnerons dans la suite une description détaillée de sa préparation.

Avant d'entreprendre la description de la fabrication des différents milieux de culture essayés et avant de dresser les tableaux comparatifs qui s'y rapportent, nous tenons, pour éviter toute équivoque, à fixer certains points :

1. Nous entendons par *petit-lait* ce que l'on appelle aussi sérum, ou résidu de fromagerie. Notre petit-lait est conforme à la définition qu'en donne le « Nouveau Larousse illustré » au tome V et qui dit : Petit-lait = Sérosité qui se sépare du lait quand il se caille.

2. Tous nos milieux de culture sont à base de gélose (1,6 %), répartis, à raison de 10 cm³ par tube, dans des tubes à essai de même dimension et inclinés, encore chauds, de la même manière, afin de présenter des surfaces de culture égales. Tous nos milieux ont été clarifiés à l'albumine et filtrés pour les rendre parfaitement transparents, puis tous ajustés au même pH = 6,9.

3. Comme milieu de référence, nous avons utilisé la gélose au bouillon de viande de cheval, préparé selon la formule courante, peptoné à 1 % (Peptone Witte), salé à 0,5 % NaCl et ajusté au pH 6,9. A titre d'indication, nous ajoutons que le bouillon non peptoné contenait 1,07 %₀₀ d'azote total, et après addition de 1 % de peptone Witte, 3,71 %₀₀ d'azote total. Ce milieu de référence est désigné dans

nos tableaux par M. R. Son emploi permet de faire des comparaisons non seulement dans un même tableau, mais encore d'un tableau à l'autre; car, quel que soit le nombre des colonies qui, à chaque essai, se sont développées sur le milieu, leur nombre est toujours représenté dans les tableaux par le nombre 100; les nombres figurant pour les autres milieux sont par conséquent des nombres proportionnels.

4. Tous lesensemencements de lait ont été pratiqués d'une manière uniforme, selon la méthode de BURRI [1]. L'anse utilisée était formée par un fil de platine de 0 mm. 38 de diamètre, terminé en boucle ronde et fermée de 1 mm. 50 de diamètre intérieur. Cette anse constitue l'anse quantitative, établie à la suite de nos recherches dont les résultats seront publiés prochainement.

A. MILIEUX A BASE DE PRODUITS DE DIGESTIONS TRYPTIQUE ET PANCRÉATIQUE DE SANG DE BŒUF.

Ce sont les expériences déjà anciennes d'HOTTINGER [2], sur la préparation des bouillons par digestion pancréatique de la viande, qui ont servi à nos expériences.

Préparation du bouillon de sang par digestion pancréatique de sang de bœuf coagulé et bouilli.

1. Recueillir, à l'abattoir, 2 litres de sang de bœuf.
2. Laisser coaguler le sang durant quelques heures.
3. Porter le récipient à l'autoclave à 120° durant une heure.
4. Passer le caillot bouilli au hâche-viande pour le réduire en purée.
5. Mettre dans un bocal suffisamment grand 1.500 gr. de purée de sang bouilli, 2.250 gr. d'eau à 45°, 10 gr. de cristaux de carbonate de sodium, 2 gr. de trypsine (Merck), 3 gr. de pancréatine paillottée (Merck) et 30 cm³ de chloroforme.

6. Agiter énergiquement le flacon, après l'avoir muni d'un bouchon percé d'un petit trou, que l'on obture avec le doigt pendant l'agitation.

7. Placer le bocal à l'étuve à 38-40° durant 6 jours en ayant soin de l'agiter 3 à 4 fois par jour.

8. A la fin des 6 jours, ajouter 20 cm³ d'acide chlorhydrique pur et concentré pour faire cesser la digestion. Agiter, puis filtrer.

9. On obtient un filtrat clair et jaune, que l'on chauffe durant 45 minutes à l'autoclave non boulonné, dans la vapeur fluante, pour éliminer le chloroforme.

Ce bouillon acide possède une teneur moyenne en azote total de 8 gr. 5 par litre. Cette teneur ne se modifie guère en laissant la digestion se poursuivre plus longtemps que 6 jours. Le bouillon contient une quantité assez considérable d'acides aminés, car, conservé à la glacière, il abandonne des cristaux de leucine et tyrosine qui tapis-

sent le fond et les parois du récipient. Nous avons dilué ce bouillon avec 4 parties d'eau pour ramener sa teneur en azote total à 2 ‰ environ. Le bouillon dilué a été ensuite additionné de 4 gr. de sel marin et de 1 gr. de phosphate de sodium par litre, neutralisé, gélosé (1,6 ‰), clarifié et ajusté au pH 6,9. Ce milieu porte le nom de *gélose au sang trypsiné* et figure au tableau sous le N° 1. Avec ce même bouillon dilué et salé, nous avons préparé un milieu lactosé à 1 ‰ aux conditions du milieu précédent. Il porte le nom de *gélose au sang trypsiné lactosée* et figure sous le N° 2.

I. TABLEAU COMPARATIF DES MILIEUX M. R. N° 1, N° 2

Essais	M. R.	N° 1	N° 2
1	100	98	148
2	100	69	194
3	100	94	116
4	100	119	139
5	100	105	129
6	100	90	109
7	100	100	160
8	100	—	131
9	100	—	155

Il ressort d'emblée, du tableau I, que dans le milieu 2, la présence de lactose rend celui-ci beaucoup plus favorable. Le N° 1, par contre, est inférieur au M. R.

B. MILIEUX DE CULTURE A BASE DE LAIT TRYPSINÉ.

Ce genre de milieu préconisé par GUITTONNEAU [3] et ses collaborateurs, a fait de notre part l'objet d'une étude. Notre procédé de préparation du lait trypsiné étant différent de celui de ces auteurs, nous le décrirons ci-dessous complètement.

Préparation du bouillon de lait par digestion pancréatique du lait écrémé.

1. Chauffer 3 litres de lait écrémé durant 30 minutes à l'autoclave non boulonné, puis les refroidir à 42°, et les transvaser dans un flacon à col étroit de 5 litres de capacité et muni d'un bouchon percé d'un petit trou.

2. Doser l'acidité du lait sur un échantillon de 10 cm³.

3. Ajouter à ce lait la quantité de cm³ de NaOH 2 n. nécessaires pour neutraliser les 3 litres, selon le degré d'acidité trouvé dans l'opération précédente.

4. Peser 3 gr. de trypsine (Merck) et 3 gr. de pancréatine pailletée (Merck) et les délayer dans un mortier avec 10 à 15 cm³ d'eau distillée; (il est important, dans cette opération, de bien délayer les ferments avec un pilon pour faire disparaître les grumeaux qui se forment).

5. Ajouter les ferments délayés au lait.

6. Additionner encore ce lait de 3 gr. de Na_2CO_3 pur et sec, puis ajouter 30 cm³ de chloroforme.

7. Agiter énergiquement le flacon en ayant soin de mettre le doigt sur l'ouverture du bouchon, puis placer le flacon à l'étuve à 38-40°, durant 6-7 jours, en ayant soin de l'agiter 3 à 4 fois par jour.

8. Après 7 jours, transvaser le contenu du flacon dans un récipient émaillé et neutraliser le liquide en ajoutant une quantité de HCl 2 n. égale à celle de NaOH 2 n., employée au temps 3, et en plus 30 cm. de HCl 2 n. pour neutraliser les 3 gr. de Na_2CO_3 ajoutés au temps 6.

9. Chauffer à l'autoclave non boulonné, durant 45 minutes, le liquide de digestion (à ce moment-là légèrement acide) pour éliminer le chloroforme.

10. Filtrer jusqu'à obtention du liquide clair.

En opérant avec de la trypsine et de la pancréatine de bonne qualité, on obtient d'une fois à l'autre un liquide contenant de 5,5 à 5,7 ‰ d'azote total. Ce liquide constitue le lait trypsiné qui servira après dilution convenable à préparer des milieux de culture gélosés à 1,6 ‰, clarifiés et ajustés au pH 6,9.

Il est vivement recommandé de ne jamais chauffer le lait trypsiné au-dessus de 100°, de manière à éviter le brunissement. Lors de la préparation des milieux gélosés, on dissoudra, tout d'abord, la quantité de gélose nécessaire au milieu dans la quantité d'eau de dilution à employer, en portant le tout à 120° à l'autoclave durant 30 minutes. On ajoutera, seulement après cette opération, la quantité de lait trypsiné, puis le sel marin à raison de 0,5 ‰ et le phosphate de sodium à raison de 0,1 ‰, calculés par rapport à l'eau de dilution. On clarifie, puis ajuste comme précédemment au pH 6,9. La stérilisation finale doit être effectuée à 100° à l'autoclave non boulonné.

Nous avons étudié trois milieux au lait trypsiné différents uniquement par leur dilution.

Milieu N° 3 Lait trypsiné 1 partie, eau de robinet 2 parties

» » 4 » » 1 » » » » 3 »
 » » 5 » » 1 » » » » 4 »

II. TABLEAU COMPARATIF DES MILIEUX M. R. N° 3, N° 4, N° 5

Essais	M. R.	N° 3	N° 4	N° 5
1	100	159	131	170
2	100	112	135	156
3	100	112	104	109
4	100	94	100	123
5	100	114	157	129
6	100	139	113	99
7	100	135	217	83

(Suite du tableau de la page 805.)

Essais	M. R.	N° 3	N° 4	N° 5
8	100	107	105	102
9	100	110	162	104
10	100	136	125	88
11	100	106	120	108
12	100	71	79	80
13	100	120	200	260

A considérer les chiffres du tableau II, les milieux 3 et 4 se tiennent de très près, le milieu 4 toutefois est plus favorable au développement des bactéries. Le milieu 5, quoique sujet à fournir de plus grosses variations, est cependant, comme les deux autres, d'une valeur supérieure au milieu M. R.

C. MILIEUX A BASE DE PETIT-LAIT.

Désalbumination du petit-lait.

1. Prendre du petit-lait résultant de la fabrication du fromage d'Emmental (1) et l'additionner de 1,5 % de chlorure de sodium.

2. Répartir ce petit-lait salé dans des matras bouchés à l'ouate.

3. Chauffer les matras à l'autoclave à 105° durant 1 heure.

4. Laisser reposer dans les matras le petit-lait désalbuminé durant 24 heures, puis filtrer la quantité dont on a besoin, les autres matras restant à disposition.

Gélose au petit-lait dilué peptoné.

Nous avons fait remarquer au sujet du milieu de référence M. R. que l'introduction de 1% de peptone Witte dans du bouillon de viande de cheval élève la teneur en azote total du milieu de 1,07 ‰ à 3,71 ‰, soit une augmentation de 2,64 ‰. Aussi pour nous en tenir à un milieu à 2 ‰ environ d'azote total, avons-nous préparé notre nouveau milieu en utilisant seulement 0,8 % de peptone. Cependant, afin de nous rendre compte de l'influence que pourrait avoir sur la valeur du milieu de culture la présence d'une plus grande quantité d'éléments azotés, nous avons préparé un milieu du même genre à 1,6% de peptone. Ces deux milieux portent respectivement les N°s 6 et 7.

Préparation du milieu au petit-lait dilué peptoné.

1. Dissoudre à 120° à l'autoclave 24 gr. de gélose dans 1.100 cm³ d'eau de robinet.

2. Ajouter au liquide chaud 12 gr. de peptone Witte, 2 gr. de

(1) Il est probable que le petit-lait résultant de la fabrication de tous les fromages emprésurés, et peut-être même celui des fromages fabriqués par coagulation spontanée du lait, conviennent aussi, moyennant, le cas échéant, certaines modifications, à cette préparation.

phosphate de sodium, puis 400 cm³ de petit-lait désalbuminé selon la méthode indiquée auparavant.

3. Ajuster au pH 6,9, puis clarifier à l'albumine.

4. Filtrer, puis remplir des tubes à essais bouchés à l'ouate et stérilisés à raison de 10 cm³ par tube.

5. Stériliser les tubes remplis en les chauffant 2 jours de suite et durant une heure chaque fois à 100° à l'autoclave non bouloonné (1).

6. Pencher les tubes après le deuxième chauffage et les laisser environ 15 jours dans un local sec avant de les utiliser.

Ce milieu constitue notre milieu de choix, dit : *gélose au petit-lait dilué peptoné*.

Il est, comme on le voit, facile à préparer et cette préparation peut être considérée comme d'exécution rapide quand on dispose de petit-lait désalbuminé tout prêt dans les matras.

III. TABLEAU COMPARATIF DES MILIEUX M. R. N° 6 ET N° 7

Essais	M. R.	N° 6	N° 7
1	100	82	97
2	100	147	116
3	100	133	145
4	100	140	102
5	100	171	190
6	100	114	157
7	100	143	103
8	100	89	93
9	100	119	150
10	100	142	126
11	100	138	108

Tout d'abord, il ressort du tableau III qu'une quantité double de peptone dans le milieu n'améliore aucunement celui-ci. D'autre part, à considérer le rendement de ces milieux mis en regard du rendement des milieux précédents, on remarque tout de suite qu'ils ne leur sont inférieurs en aucun cas et que le milieu N° 6 constitue bien le milieu simple et peu coûteux que nous recherchions.

Cependant, pour diminuer encore le prix de revient de notre milieu, nous avons essayé différentes peptones, autres que celle de Witte, qui est d'un prix très élevé. Les peptones de la Maison Merck à Darmstadt, dénommées, la première « Peptone pour l'usage bactériologique » et la seconde « Peptone sèche de viande », ont été mises à l'épreuve. Nous en avons préparé deux milieux numérotés respectivement 8 et 9 et pour lesquels les données et le mode de fabrication figurant dans la préparation de la gélose au petit-lait dilué peptoné, ont été utilisés intégralement; seule, la peptone a changé.

(1) On peut cependant, en procédant soigneusement à la stérilisation sous 0,6-0,7 atmosphère de pression pendant 30 minutes, obtenir un milieu très satisfaisant. C'est ce que nous faisons dans la pratique courante du laboratoire.

Peptone pour l'usage bactériologique « Merck » : milieu N° 8.

Peptone sèche de viande « Merck » : milieu N° 9.

IV. TABLEAU COMPARATIF DES MILIEUX M. R. N° 6, N° 8, N° 9

Essais	M. R.	N° 6	N° 8	N° 9
1	100	88	103	72
2	100	106	116	93
3	100	107	107	90
4	100	122	109	69
5	100	112	101	81
6	100	187	145	90
7	100	115	117	85
8	100	116	106	80

Les milieux 6 et 8 sont pour ainsi dire équivalents, par contre le milieu 9 est notoirement inférieur. La « peptone pour l'usage bactériologique » Merck utilisée dans le milieu 8 peut donc remplacer avantageusement la peptone Witte. Cette peptone Merck est d'un prix moitié moins élevé que la peptone Witte, ce qui diminue encore le prix de revient du milieu de culture. D'autre part, la Maison Merck nous a communiqué que sa « peptone pour l'usage bactériologique » était obtenue par digestion pancréatique et hydrolyse de la caséine. Elle se présente donc comme un produit nourricier très favorable au développement des microbes du lait et le milieu préparé avec cette peptone peut être facilement et même très complètement rapproché des milieux 3 et 4 à base de lait trypsiné.

Le milieu N° 8, préparé selon les indications du milieu 6, mais avec la « peptone pour usage bactériologique » Merck, constitue le milieu-type adopté maintenant en Suisse pour les concours entre producteurs de lait.

Nous tenons pour terminer à relever le fait suivant : Pour la recherche des bactéries acidifiantes par les cultures en couche profonde, seule la gélose au petit-lait dilué et *peptoné à la peptone Witte* convient, car cette peptone permet aux bactéries acidifiantes de provoquer autour de leurs colonies la formation d'une auréole, qui les différencie nettement des colonies de bactéries non acidifiantes. Cette propriété caractéristique est attribuable au fait que, dans les solutions de peptone Witte, l'adjonction d'une petite quantité d'un acide faible détermine la formation d'un précipité très ténu mais très bien marqué. L'auréole due à l'acidité a donc une importance considérable au point de vue diagnostic.

Nous tenons à remercier M. M. BINZ, préparateur, pour la collaboration qu'il nous a apportée dans la fabrication des milieux de culture.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BURRI R. Worlds Dairy Congress London 1928, Report, pp. 690-696. *Le Lait*, 1929, 9, p. 1028.
[2] HOTTINGER. Centr. Blatt für Bakt. I. Abt. Orig. 67, p. 178.
[3] GUITTONNEAU, SAJOUS et PEET. *Le Lait*, 10, 1930, p. 627.

LE NETTOYAGE CENTRIFUGE DU LAIT DANS LA FABRICATION DU FROMAGE DE COMTÉ

(1^{er} Mémoire — *Etude industrielle*)

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

Chef de travaux à la Station
de Poligny

Travail de l'Institut des Recherches Agronomiques

Dans les conditions de fabrication aujourd'hui réalisées à l'Ecole d'Industrie laitière de Poligny, nous obtenons régulièrement des fromages de Comté de premier choix. Leur ouverture, le plus souvent normale, a quelquefois cependant une légère tendance à se montrer « un peu chargée ».

Cet état de choses n'a été en rien modifié dans les fromages que nous avons fabriqués en faisant usage d'un matériel soigneusement désinfecté, d'extraits de présures exempts de germes aérogènes et de levains lactiques préparés au laboratoire, à l'abri de toute contamination (1). Il n'est donc imputable qu'aux microorganismes contenus dans les laits reçus au chalet.

Toutes mesures propres à améliorer les conditions hygiéniques de la traite ayant été prises par ailleurs, nous nous sommes demandés si nous n'aurions pas en outre intérêt à débarrasser de leurs impuretés solides aussi parfaitement qu'il est aujourd'hui possible de le faire, les laits reçus à la fromagerie. Le tamisage auquel nous les soumettons régulièrement n'ayant à cet égard qu'une efficacité depuis longtemps reconnue fort médiocre, le nettoyage centrifuge n'était-il pas tout indiqué pour pousser à fond l'épuration envisagée ?

A première vue, les avantages que pouvait présenter pour nous une opération de ce genre ne semblaient guère douteux. Les particules solides que renferme le lait sont en effet entraînées par le caillé au cours du travail en chaudière. Elles se retrouvent donc dans le fro-

(1) Voir G. GUITTONNEAU, J. KEILLING et A. BARRET : Les Présures commerciales dans la fabrication des fromages à pâte cuite. *Le Lait*, 1926, p. 170 et suivantes.