LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

G. GUITTONNEAU ET M^{lle} J. BRIGANDO. — Observations relatives à la coloration des microbes préalablement chauffés dans le lait 577

G. BARTHÉLEMI. — A propos de gares laitières 587

J. Y. PISSAREWSKY. — Contribution à l'étude du lait de bufflesse. Production, propriétés, composition et dérivés (suite) 592

O. GRATZ. — A propos de la théorie de la désacidification électrique du lait . . . 611

Revue :

G. GÉNIN. — Le nettoyage des objets étamés en laiterie 612

Bibliographie analytique :

1^o Les livres 615

2^o Journaux, Revues, Sociétés savantes 622
3^o Brevets 673

Bulletin bibliographique :

1^o Journaux, Revues, Sociétés savantes. 673
2^o Brevets 680

Documents et informations :

Législation étrangère. —
Tchécoslovaquie : Production et commerce du lait et des produits laitiers . . . 681
Arrêt de la Chambre criminelle de la Cour de Cassation sur la dénomination « lait frais » 686
La fièvre typhoïde et le lait . . . 687
Exportation du beurre de Hollande 688
Création d'un Comité du lait dans divers départements . . 688
Relevé des déclarations de stocks de beurres conservés dans les entrepôts frigorifiques au 4 avril 1936 . . 688

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

OBSERVATIONS RELATIVES A LA COLORATION DES MICROBES PRÉALABLEMENT CHAUFFÉS DANS LE LAIT (2)

par

G. GUITTONNEAU

et

M^{lle} JEANNE BRIGANDO

Professeur à l'Institut agronomique
Directeur du Laboratoire National
des Industries laitières

Docteur ès sciences
de l'Université de Lyon

INTRODUCTION

Au cours d'études sur la pasteurisation des laits, poursuivies en 1932 sous la direction de l'un de nous en collaboration avec

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

(2) Voir aussi Comptes Rendus Académie des Sciences, 11 mai 1936, t. 202, p. 1622 : Sur une résistance aux colorations de certains corps microbiens, acquise par chauffage dans le lait, par G. GUITTONNEAU et M^{lle} J. BRIGANDO.

M. J. KEILLING et M^{lle} Chr. DEGUY (1), on avait noté de curieuses anomalies de colorations microbiennes dans des laits fortement chauffés. L'essentiel des observations relevées à cette époque peut se ramener à ce qui suit :

Lorsqu'ils avaient été soumis à une épreuve de chauffage énergique dans du lait frais, ou dans du lait préalablement soumis à la pasteurisation industrielle, certains représentants de la flore microbienne du lait, les ferments lactiques en particulier, refusaient de prendre la coloration par le traitement classique au bleu de méthylène aqueux. Mais la colorabilité de ces mêmes microbes au bleu de méthylène redevenait normale lorsqu'on avait traité les préparations par l'acide acétique dilué. Les chauffages d'épreuves que nous avons institués dans ces essais se faisaient soit pendant 1 heure à 100° C., soit pendant 20 minutes à 120° C.

Ce phénomène intéressant en lui-même peut, par ailleurs, se trouver en relation plus ou moins directe avec l'accroissement bien connu de la thermo-résistance des ferments lactiques lorsque le chauffage se fait dans le lait. Or, il ne saurait être correctement expliqué par aucune des données microbiologiques vers lesquelles se porte l'attention.

Si, en effet, il ne s'agissait que d'un simple dépôt caséinatique à la surface des corps microbiens comme dans certains cas envisagés par GORINI [1], le dépôt superficiel serait, à l'inverse des faits enregistrés, facilement et fortement colorable par le bleu de méthylène.

Et comme, d'autre part, les chauffages dans l'eau ou le sérum physiologique ne confèrent jamais aux ferments lactiques la même résistance au colorant que les chauffages dans le lait, on ne peut accepter non plus l'idée d'un simple effet de protection capsulaire accentué par le traitement thermique.

Sur ces premières données, on pouvait déjà établir une hypothèse de travail. Le chauffage dans le lait pourrait avoir comme conséquence, pour certains microorganismes, une sorte d'enrobage par une substance protectrice de nature inconnue, réfractaire à l'action du bleu de méthylène et soluble dans l'acide acétique dilué ou dissociable par cet acide.

Nous nous sommes proposés de soumettre cette hypothèse à des vérifications expérimentales en recherchant des précisions sur l'existence et éventuellement sur la nature de la substance protectrice envisagée.

Le thème général de nos recherches a été d'inspiration purement

(1) Expériences réalisées à la Laiterie Coopérative des Paysans de l'Yonne (Auxerre) par G. GUITTONNEAU, J. KEILLING et M^{lle} Chr. DEGUY, avec le concours de MM. R. ROBINEAU, président du Conseil d'administration, et BIGORRE, directeur.

analytique : nous nous sommes efforcés de dissocier l'ensemble des différents facteurs qu'on peut songer à mettre en cause pour expliquer les faits observés. Et cela nous a conduits :

1° A substituer au lait, comme milieu d'étude, d'autres solutions ou pseudo-solutions plus simples et notamment celles où on introduisait de la caséine, en mêmes proportions que dans le lait, soit à l'état de complexe caséinate de Calcium + phosphate de calcium, soit à l'état de caséinate de Calcium ou de sodium. Les divers composés caséinatiques étaient préparés par la voie synthétique, suivant les techniques indiquées par Ch. PORCHER [2].

2° A faire porter nos observations sur des groupes microbiens à affinités différentes.

3° A préciser les particularités de coloration des microorganismes choisis et mis en suspension dans nos milieux d'étude aussi bien avant qu'après le chauffage d'épreuve.

Ces directives étant dès maintenant formulées, nous adopterons comme cadre, pour l'exposé de nos études, la division suivante en deux parties :

A. — Sur les essais de coloration au bleu de méthylène de quelques microbes types préalablement soumis aux épreuves de chauffage.

B. — Figures diverses de colorations observées sur les microbes types soumis ou non aux épreuves préalables de chauffage.

A. — SUR LES ESSAIS DE COLORATION AU BLEU DE MÉTHYLÈNE DE QUELQUES MICROBES TYPES PRÉALABLEMENT SOUMIS AUX ÉPREUVES DE CHAUFFAGES.

Les épreuves thermiques ont été les mêmes dans nos recherches que dans les essais préalablement rappelés. Elles ont donc comporté un chauffage soit à 100° C. pendant 1 heure, soit à 120° C. pendant 20 minutes.

Les microbes types que nous avons choisis ont été : a) des ferments lactiques : *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus thermophilus*, *Thermobacterium lactis* et *Thermobacterium helveticum* ; b) Un pseudo-ferment lactique *B. Coli*. Deux bacilles dont une souche de *B. subtilis* et une de *B. megatherium*. Tous ces microbes provenaient de la collection du Laboratoire national des Industries laitières.

En principe, le mode opératoire était le suivant : On partait d'une culture de 24 heures, mise en suspension dans l'eau distillée stérilisée. A 10 cm³ de lait d'un de nos milieux synthétiques, on ajoutait 10 gouttes de cette dilution. Immédiatement après cette addition, les liqueurs étaient chauffées une heure à 100°. A la suite du chauffage, les milieux ne paraissaient pas altérés et l'on n'observait aucun précipité.

Après étalement d'une goutte de liquide sur lame et fixation, les préparations étaient colorées par le bleu de méthylène en solution aqueuse à 1 % (1). Nous avons déterminé, par une série d'essais, que le mode de fixation (à l'alcool ou à la chaleur) n'intervenait pas dans le phénomène étudié.

1. Ferments lactiques chauffés dans le lait. — Le lait cru et le lait pasteurisé du commerce nous ont toujours donné les mêmes résultats.

Streptococcus cremoris et *Thermobacterium helveticum* se détaient en blanc sur le fond de la préparation. Pour *Streptococcus thermophilus*, on apercevait quelquefois un petit point central sombre.

Thermobacterium lactis était le plus souvent coloré. Dans ce cas, on remarquait fréquemment une bande blanche autour du corps microbien ou sur un de ses côtés.

1. *Streptococcus thermophilus* chauffé dans du lait. Coloration au bleu de méthylène dilué.

Nous avons contrôlé que ces préparations traitées par l'acide acétique étendu à 1 % se coloraient parfaitement, observation déjà faite antérieurement.

Si le lait avait été chauffé une heure à 100° avant d'être additionné de ferments lactiques, le phénomène se reproduirait d'une façon très irrégulière et en général très mal.

(1) Dans des recherches ultérieures nous avons amélioré cette technique : 1° en rassemblant et en lavant les microbes des cultures par centrifugation ; 2° en préparant les frottis avec les culots de centrifugation des tubes chauffés. On obtenait ainsi les préparations beaucoup plus chargées en germes et cela facilite grandement les observations.

Si on opérait avec des laits préalablement stérilisés (20 minutes à 120°), les ferments lactiques gardaient leur colorabilité normale, comme s'ils n'avaient pas été chauffés.

2. *Streptococcus thermophilus* chauffé dans du lait. Préparation traitée par l'acide acétique à 1 %. Coloration au bleu de méthylène dilué.

3. *Thermobacterium lactis* chauffé dans de l'eau distillée. Coloration au bleu de méthylène dilué.

2. Ferments lactiques chauffés dans le complexe caséinate de calcium + phosphate de calcium. — *Tb. lactis*, et *Tb. helveticum* chauffés dans le complexe : caséinate + phosphate de calcium ont présenté le même aspect qu'après chauffage dans le lait.

Pour *Sc. thermophilus*, les résultats ont été analogues bien que les ponctuations sombres aient été plus marquées.

3. Ferments lactiques chauffés dans le caséinate de calcium et le caséinate de sodium. — Les essais effectués avec le caséinate de calcium et le caséinate de sodium à $pH = 6,6$ nous ont donné des résultats beaucoup moins nets qu'avec le complexe et l'interprétation de ces résultats reste trop incertaine pour comporter des conclusions précises.

4. *Thermobacterium lactis* chauffé dans du lait. Coloration au bleu de méthylène dilué.

4. Ferments lactiques chauffés dans une solution de gélatine phosphatée ou en présence de phosphate bicalcique.

— Comme épreuves complémentaires, les ferments lactiques ont été chauffés dans une solution de gélatine tenant en suspension les mêmes quantités de phosphates de calcium que le complexe et d'autre part avec une solution filtrée de phosphate bicalcique à saturation.

Dans l'un et l'autre cas, les germes étudiés se coloraient normalement, après comme avant le chauffage.

5. Ferments lactiques chauffés dans le sérum d'emprésurage. — Dans le sérum d'emprésurage du lait, d'où la caséine est pratiquement éliminée, on a mis en suspension les ferments lactiques et on les a chauffés une heure à 100° . Par suite du chauffage, il y a eu coagulation de l'albumine du sérum. Les bactéries examinées prenaient les colorants. Des observations répétées nous ont d'ailleurs montré que le phénomène étudié ne se produit qu'à la condition qu'il n'y ait pas de précipitation brutale de la protéine et que

le fond de la préparation soit homogène. C'est ainsi que les laits acides qui s'altèrent au cours du chauffage ne nous ont jamais donné de résultats positifs.

6. Observations relatives à l'état cultural des souches de ferments lactiques employées. — Nous avons employé, dans nos essais, comme nous l'avons déjà indiqué, des souches de ferments lactiques réensemencées chaque jour en lait stérile, afin de nous trouver toujours dans les mêmes conditions.

5. *Thermobacterium lactis* chauffé dans le complexe caséinate de calcium + phosphate de calcium. Coloration au bleu de méthylène dilué.

Certains ferments lactiques de la collection repiqués tous les huit jours et qui présentaient à l'étude des résultats douteux donnèrent des résultats positifs après 5 ensemencements en lait stérile, répétés à des intervalles de 24 heures. Cette propriété une fois acquise ne se perd pas facilement avec le temps. C'est ainsi qu'une de nos cultures types, vieille de 15 jours, chauffée dans le lait, présentait la même résistance à la coloration qu'une culture de 24 heures.

7. Extension des essais précédents à d'autres microbes que les ferments lactiques vrais. — Nous avons chauffé dans du lait cru, une heure à 100°, les microbes suivants déjà indiqués : un pseudo-ferment lactique, le *B. Coli*, et deux bacilles : *B. subtilis* et *B. megatherium*. Le chauffage des mêmes microbes a également été effectué dans une solution de caséinate de calcium.

Les préparations ont été colorées comme précédemment par le bleu de méthylène.

B. Coli s'est comporté comme les ferments lactiques. *B. subtilis* et *B. megatherium* se coloraient au contraire aussi bien qu'avant chauffage.

8. Hypothèse basée sur l'ensemble des observations ci-dessus relatées. — Les ferments lactiques chauffés dans de l'eau ou du sérum physiologique se colorant facilement, nous avons été conduits, pour expliquer la résistance à la coloration de ces mêmes microorganismes, chauffés dans le lait ou les phospho-caséinates, à envisager l'hypothèse d'une réaction possible sous l'action de la chaleur entre les complexes caséinatiques et les membranes ou enveloppes microbiennes.

Le phénomène ne se produisant pas avec certains microbes, entre autres le *B. subtilis* et le *B. megatherium*, on peut en déduire que la nature des membranes ou enveloppes semble jouer ici un rôle décisif.

B. FIGURES DIVERSES DE COLORATIONS OBSERVÉES SUR LES MICROBES TYPES SOUMIS OU NON AUX ÉPREUVES PRÉALABLES DE CHAUFFAGES.

1. Microbes préalablement chauffés dans le lait. — — En vue d'arriver à colorer les ferments lactiques chauffés dans le lait, nous avons étudié différents procédés de coloration.

Rappelons tout d'abord qu'un traitement de la préparation à l'acide acétique dilué permet d'obtenir la coloration normale de ces microorganismes par le bleu de méthylène.

Le violet de gentiane aniliné, le bleu de Unna, l'hématoxyline, le Gram, différents colorants acides, nous ont donné les mêmes résultats que le bleu de méthylène.

En laissant les préparations de 10 à 12 heures dans un bain dilué de bleu de méthylène, de violet de gentiane, etc., nous sommes arrivés facilement à colorer les corps microbiens, mais ceux-ci apparaissaient entourés d'une auréole claire.

Par la fuschine phéniquée de Ziehl, les ferments lactiques se coloraient en rouge vif, mais ils étaient entourés d'une bande non colorée qui s'élargissait plus ou moins par endroits. Par traitement au Ziehl à chaud et différenciation par l'acide acétique, la gaine semblait moins importante et présentait un peu l'aspect d'une capsule analogue à celle qu'on observe après coloration par les mêmes techniques, sur les pneumocoques cultivés dans le sérum sanguin.

2. Ferments lactiques non chauffés. — Les ferments lactiques étudiés dans les caséinates ou le lait, et traités par les colorants habituels, sont généralement entourés d'une bande claire. Dans l'albumine, le sérum sanguin, le phénomène n'est pas aussi net,

mais, par la fuchsine phéniquée de Ziehl, on peut toujours mettre en évidence des aspects capsulaires qui rappellent les figures microscopiques précédemment définies.

3. Bacilles non chauffés. — Il était intéressant d'examiner les suspensions de *B. subtilis* et de *B. megatherium*. Dans le lait et les caséinates, il nous a été impossible, par le bleu de méthylène, le violet de gentiane et autres colorants déjà cités, de mettre en évidence aucun aspect capsulaire. Mais avec le Ziehl, ces aspects se laissaient nettement déceler.

Conformément aux vues de BONI [3], il nous a donc été possible dans tous les cas de mettre en évidence des aspects capsulaires autour de nos microbes types.

4. Récapitulation et confrontation des résultats précédemment formulés. — On peut résumer l'essentiel des résultats auxquels ont abouti les observations précédentes dans le tableau suivant où il n'a été tenu compte que des études faites dans le lait et dans les solutions de phospho-caséinates de calcium.

En consultant ce tableau, on verra apparaître un certain rapport

Confrontation de quelques figures de coloration observées.

Microorganismes étudiés	Colorants utilisés	
	Bleu de méthylène, Violet de gentiane	Ziehl à chaud et différenciation par l'acide acétique
<i>Ferments lactiques</i>	Après chauffage dans le lait ou le phospho-caséinate :	
	Gaine blanche recouvrant totalement la surface : <i>Sc. cremoris</i> — <i>Tb. helveticum</i>	Coloration avec auréole claire
	Gaine blanche plus ou moins nette, bordure autour du bâtonnet <i>Tb. lactis</i>	
	Sans chauffage dans le lait ou le caséinate :	
	Bordure blanche et plus ou moins nette	Coloration avec auréole claire
<i>B. subtilis</i> et <i>B. megatherium</i>	Après chauffage dans le lait ou le caséinate :	Coloration avec auréole claire
	Coloration totale	
	Sans chauffage dans le lait ou le caséinate :	
	Pas d'auréole visible	Coloration avec auréole claire

entre la résistance aux colorants des organismes chauffés dans le lait ou dans les solutions de phospho-caséinates et leurs figures de coloration observées dans les mêmes milieux non chauffés. Il faut mettre à part les colorations par le Ziehl qui ne conduisent à aucune différenciation entre les types microbiens examinés.

RÉSUMÉ ET CONCLUSION

A. En étudiant la colorabilité de certains ferments lactiques, préalablement soumis à une épreuve de chauffage énergétique dans le lait, nous avons noté les particularités suivantes :

a) Les microbes acquéraient par ce traitement une résistance anormale à la coloration par la plupart des techniques usuelles de la bactériologie (traitement classique au bleu de méthylène aqueux, au violet de gentiane aniliné, au bleu de Unna, à divers colorants acides ou encore par la méthode de Gram).

b) Des colorations par ces mêmes techniques pouvaient cependant être obtenues en prolongeant beaucoup la durée de contact avec les colorants (10 ou 12 heures au lieu de quelques minutes).

c) La colorabilité des mêmes microbes par les mêmes méthodes redevenait normale sur les préparations préalablement traitées par l'acide acétique dilué.

d) Les colorants énergiques comme la fuchsine phéniquée de Ziehl agissant à chaud coloraient les ferments lactiques presque aussi bien après qu'avant les épreuves de chauffage.

B. Lorsque, dans des essais analogues aux précédents, on remplaçait les ferments lactiques par des bacilles comme *B. subtilis* ou *B. megatherium*, aucune modification dans la colorabilité des microbes ne se manifestait après les chauffages d'épreuves.

C. Mis en suspension dans du lait mais non chauffés dans ce liquide, tous les microorganismes précédemment énumérés se coloraient facilement par les méthodes classiques et notamment par simple traitement au bleu de méthylène aqueux. Traités par ce dernier colorant les ferments lactiques apparaissaient entourés d'auréoles claires plus ou moins nettes. Aucune auréole analogue n'a pu être nettement discernée dans les mêmes conditions, ni avec *B. subtilis*, ni avec *B. megatherium*. Après coloration à la fuchsine phéniquée de Ziehl et différenciation à l'acide acétique, les auréoles claires étaient au contraire visibles dans tous les cas.

D. Les particularités de coloration que nous venons de définir ont été retrouvées semblables à elles-mêmes quoique plus ou moins atténuées dans d'autres séries d'essais où nous avons remplacé le lait par des pseudo-solutions d'un complexe caséinophosphatique de calcium. La résistance aux colorations par le bleu de méthylène ne s'est pas manifestée au contraire sur des ferments lactiques forte-

ment chauffés dans des lacto-sérums d'où les complexes caséino-phosphatiques du lait avaient été éliminés par emprésurage.

* * *

L'ensemble des faits précédents tend évidemment à confirmer l'hypothèse de laquelle nous sommes partis en abordant ce travail. Ils permettent en outre de donner à cette hypothèse une forme plus précise.

On peut admettre qu'une réaction d'ordre physique ou chimique intervient entre les couches superficielles des membranes microbiennes ou les capsules qui les recouvrent d'une part, et d'autre part un élément colloïdal du milieu en l'espèce les phospho-caséinates. Cette réaction, amorcée déjà à la température ordinaire, s'exagérerait sous l'influence du chauffage et elle aboutirait ou non, suivant les cas, à la formation d'une enveloppe protectrice résistant à certains colorants. Et ce serait, en fin de compte, la nature des surfaces capsulaires mises en contact avec les phospho-caséinates, et par conséquent l'espèce et l'état cultural des souches microbiennes soumises à nos chauffages d'épreuves dans le lait, qui conditionneraient l'apparition de nos formes microbiennes protégées contre l'action du bleu de méthylène.

Mais on peut aussi expliquer les faits précédemment relatés par d'autres hypothèses et notamment par celle d'adsorptions électives des colorants modifiées par l'action du chauffage.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] GORINI. Les acidoprotéolytiques dans la science et dans la pratique. *Volume Jubilaire du Professeur Ch. Porcher.*
- [2] Ch. PORCHER. Le lait au point de vue colloïdal. — Editeur : *Le Lait.*
- [3] BONI. Ricerche sulla capsula dei Bacteri. *Giorn. et Loc. ital. d'igiene*, XXIII, 1901, p. 417.

A PROPOS DE GARES LAITIÈRES

par

Le Docteur G. BARTHÉLEMI

M.R.San.I

Médecin-hygiéniste

Laboratoire d'hygiène de l'Université de Bruxelles

Le transport du lait à longue distance constitue, dans certains cas, une nécessité pour assurer l'approvisionnement des grandes villes et pose un problème parfois fort important de manutention.

On ne peut, en effet, imaginer que des étables de vaches laitières soient installées dans l'enceinte des grandes agglomérations, de