LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

W. DORNER. — Recherches
sur les bactéries propio-
niques 897

H. COUTURIER. — Dosage de
la matière grasse dans les
fromages 918

A. MOULIN. — L'utilisation
économique du froid arti-
ficiel dans la conservation
et l'amélioration des fro-
mages à pâte persillée . . . 924

Revue :

G. GÉNIN. — L'Industrie lai-
tière à l'Etranger 927

Bibliographie analytique :

1^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 931

2^o Brevets 971

XI^e Congrès internatio-
nal de laiterie (Berlin,
21-28 août 1937) :

D^r FRITZ. — L'influence des

matériaux employés sur la
construction des ustensiles
et machines pour laiteries 976

Documents et informations :

M. BEAU. — La situation lai-
tière 980

Les belles installations en lai-
terie. XI. La Laiterie Cen-
trale de Strasbourg, par
G. THIEULIN 983

L'hygiène du lait à Québec. 1004

Production du beurre en
Suède en 1938 1007

Exportations finlandaises de
produits laitiers en 1938. 1007

Le contrôle du lait aux
Etats-Unis 1008

Production de la crème glacée
aux Etats-Unis 1008

La consommation du lait en
Islande 1008

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

RECHERCHES SUR LES BACTÉRIES PROPIONIQUES

par

D^r W. DORNER

Ingénieur agronome

(Etablissement fédéral d'Industrie laitière, Liebfeld.

Directeur : D^r G. KOESTLER.)

I. INTRODUCTION

Depuis la découverte des bactéries propioniques par de FREUDENREICH et S. ORLA-JENSEN (2), en 1906, comme agents de l'ouverture du fromage, l'emploi de ces bactéries sous forme de cultures pures s'est généralisé dans la plupart des pays qui fabriquent des imitations d'Emmental. Ces dernières années, l'emploi de cultures pures de bactéries propioniques est devenu une nécessité impérieuse dans bon nombre de fromageries suisses

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

(2) DE FREUDENREICH et ORLA-JENSEN. *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1906, p. 229-328.

en raison des difficultés que les fromagers rencontraient pour obtenir une ouverture normale et à cause des défauts qui peuvent résulter d'un séjour trop prolongé du fromage à la cave chaude. Etant donné d'autre part que l'emploi de cultures de ferments propioniques n'est pas sans avoir certains inconvénients lorsqu'il est fait mal à propos, une étude de toute la question s'imposait.

Nous avons entrepris avec divers collaborateurs une étude quantitative sur le nombre des bactéries propioniques contenues dans le lait, la présure naturelle, les excréments de vache, le fromage. Nous avons étudié quelques questions de physiologie qui sont en rapport étroit avec l'emploi des cultures de bactéries propioniques. Nous avons donné une description des bactéries propioniques cocciformes et démontré leur unité génétique avec les bactéries propioniques bâtonniformes. Nous avons aussi effectué quelques essais de fromagerie pour étudier l'effet de l'ensemencement du lait avec différentes quantités de bactéries propioniques. Une partie des travaux sur lesquels nous rapportons ici a déjà été publiée en allemand et plus en détail dans l'*Annuaire agricole de la Suisse*.

II. TECHNIQUE

Le milieu de culture électif décrit par FRAZIER, SANDERS, BOYER et LONG (1) ne nous a pas donné des résultats assez satisfaisants. Nous l'avons amélioré en remplaçant les 2% de peptone Bacto par 1,5 de peptone Witte et 1,5% de peptone pour usage bactériologique de Merk. Le milieu de culture que nous avons utilisé dans ces recherches et que nous utilisons encore a la composition suivante :

- 10 grammes d'extrait de levure (Yeast extract Difco).
- 15 grammes de peptone Witte (peptone de fibrine).
- 15 grammes de peptone pour usage bact. Merk (peptone de caséine).
- 12 grammes de lactate de soude (teneur en lactate 80% environ).
- 15 grammes de gélose.
- 1.000 grammes d'eau distillée.

Dissoudre convenablement, neutraliser à pH 7,0-7,2, filtrer sur ouate, mettre en tubes et stériliser 30 minutes à 110° C.

Avant l'ensemencement, la gélose en couche profonde est fondue, puis refroidie à 45° C. Nous avonsensemencé le premier tube avec 0 cm³ 2 de lait et préparé ensuite des dilutions décimales. Etant

(1) FRAZIER, SANDERS, BOYER et LONG. *Journal of Bacteriology*, vol. XXVII, 1934, p. 539-549.

donné que des microbes appartenant au groupe *Coli* qui sont capables de fermenter le lactose gênent parfois dans les déterminations, nous avons cherché à les éliminer par une pasteurisation modérée du milieuensemencé. Nous opérons cette pasteurisation en chauffant le milieu de cultureensemencé et encore liquide dans un pot d'eau à une température de 58° C. en 5 minutes environ. Dès que la température de 58° est atteinte, nous refroidissons le milieu pour qu'il se solidifie. Cette pasteurisation bénigne détruit presque complètement les microbes gênants. Des essais ont démontré qu'elle tuait également un faible pourcentage des bactéries propioniques du lait, mais que, malgré cela, le nombre des bactéries propioniques trouvé est supérieur dans les tubes chauffés que dans les autres lorsqu'on se trouve en présence de lait contenant des bactéries du genre *Coli* capables de fermenter le lactate en nombre assez grand. Nous avons dès lors fait nos cultures en double et soumis seulement l'une des séries à la pasteurisation. Lorsque le lait ne contenait pas les bactéries *Coli* gênantes, nous avons utilisé les dilutions non pasteurisées et, dans l'autre cas, celles qui ne l'étaient pas.

Les bactéries propioniques étant anaérobies, nous avons couvert la surface du milieu solidifié avec une couche de gélose à 1,5 % dans de l'eau distillée.

Pour le fromage, nous avons effectué l'analyse sur des sondes prélevées au sortir de presse. Nous utilisons à cet effet un tube de métal à parois minces d'un diamètre de 5 millimètres environ. Le trou de la sonde est bouché en faisant fondre le fromage avec une sorte de fer à repasser spécial chauffé au méta que les skieurs utilisent pour farter leurs skis. Pour obtenir une bonne émulsion nous broyons 1 gramme de fromage avec 9 cm³ d'une solution stérile à 2 % de citrate de soude à 50° C. dans un mortier jusqu'à l'obtention d'un liquide laiteux et sans grumeaux. Nous ensemencons 1 cm³ de ce liquide dans le premier tube de gélose et nous effectuons des dilutions décimales. Comme le fromage a subi en chaudière une sorte de pasteurisation, les cas où des bactéries du genre *Coli* gênent la détermination du nombre des bactéries propioniques sont plus rares que pour le lait, aussi avons-nous renoncé à pasteuriser un double des cultures. Des essais effectués en additionnant le milieu de faibles quantités de tellurite et de tellurate de soude pour éliminer les bactéries du groupe *Coli* n'ont pas donné des résultats satisfaisants. Ces substances sont, semble-t-il, aussi actives contre les bactéries propioniques que contre celles du groupe *Coli*.

Les milieux de cultureensemencés ont été placés à 30° C. pendant au moins 10 jours. Ensuite on a dénombré les colonies

des différents types qui se sont développées et l'on en a examiné quelques-unes de chaque type au microscope pour avoir la certitude de ne pas se tromper. Dans les cas douteux, les colonies ont été isolées en culture pure et soumises à un examen physiologique approfondi.

III. LA TENEUR DU LAIT EN BACTÉRIES PROPIONIQUES (*)

Les résultats des analyses bactériologiques de 1.135 échantillons de lait sont condensés au tableau I.

TABLEAU I
TENEUR DU LAIT EN FERMENTS PROPIONIQUES BACTÉRIFORMES
ET COCCIFORMES

Teneur en centimètres cubes	Echantillons présentant les teneurs indiquées dans la première colonne.							
	Ferments propioniques bactériformes				Ferments propioniques cocciformes			
	Lait des fournisseurs		Lait de chaudière		Lait des fournisseurs		Lait de chaudière	
	Nom- bre	%	Nom- bre	%	Nom- bre	%	Nom- bre	%
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Plus de 10.000	2	0,4	0	0	4	0,7	0	0
1.001-10.000	5	1,0	1	1,5	46	8,3	0	0
501-1.000	6	1,2	0	0	19	3,4	3	42,8
101-500	28	5,6	10	14,9	90	16,1	1	14,4
51-100	18	3,6	14	20,9	65	11,6	3	42,8
31-50	13	2,6	7	10,5	162	28,9	0	0
11-30	39	7,8	19	28,4				
5-10	54	10,8	16	23,8	174	31,0	0	0
Moins de 5	336	67,0						
Total	501	100,0	67	100,0	561	100,0	7	100,0

Il découle du tableau I que la teneur du lait en ferments propioniques varie beaucoup. Plus de trois quarts des échantillons de lait des fournisseurs contenaient 10 ferments propioniques bactériformes au centimètre cube et moins. Un quart environ des laits de chaudière avaient la même teneur. Les ferments propioniques cocciformes sont plus nombreux. 31% des échantillons du lait des fournisseurs ont une teneur de 10 et moins par centimètre cube. Les laits de chaudière examinés ont tous présenté une teneur

(*) Voir aussi : W. DORNER et M. TRÖNI, *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1937, p. 861.

assez élevée en ferments propioniques cocciformes. Bien que des moyennes calculées sur des données aussi variables que celles du tableau I donnent une idée bien imparfaite de la réalité, nous donnons ci-après les teneurs moyennes des différentes catégories de lait en ferments propioniques bactériiformes et cocciformes. Dans le calcul nous avons négligé les échantillons avec des teneurs supérieures à 5.000 par centimètre cube.

TABLEAU II

	Teneur moyenne en centimètres cubes en ferments propioniques	
	Bactériiformes	Cocciformes
Laits des fournisseurs	32	251
Laits de chaudière	59	417

Il découle du tableau II que les teneurs moyennes du lait en ferments propioniques cocciformes sont sept à huit fois plus élevées que les teneurs en ferments propioniques bactériiformes.

IV. LA TENEUR DES EXCRÉMENTS DE VACHES [EN FERMENTS PROPIONIQUES (*)]

Bien que THÖNI (1) et BAUMANN (2) aient décelé des bactéries propioniques dans les excréments de vaches, il nous a paru nécessaire de répéter leurs analyses, d'autant plus que l'on attribue l'origine des ferments propioniques du lait aux matières fécales bovines. Le tableau III condense les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU III

Teneur en bactéries propioniques par gr.	0-200	201-2.000	2.001-10.000	10.001-32.000	72.000	2 millions
Nombre d'échantil- lons	7	2	8	8	1	1
%	25,9	7,4	29,6	29,6	3,7	3,7

(*) Voir aussi : W. DORNER et M. THÖNI. *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1937, p. 863.

(1) R. BURRI. *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1912, p. 481.

(2) J. BAUMANN. *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1934, p. 153.

Il découle du tableau III qu'environ 60% des 27 échantillons examinés contiennent entre 2.000 et 32.000 bactéries propioniques par gramme.

V. LA TENEUR DU PETIT-LAIT MURI ET DES PRÉSURES NATURELLES EN BACTÉRIES PROPIONIQUES

La grande majorité des fromagers suisses utilise des infusions de caillettes de veau comme présure. Certains emploient aussi des présures concentrées commerciales complétées par du petit-lait mûri. Il importait donc de savoir si les présures et le petit-lait mûri pouvaient constituer une source appréciable de bactéries propioniques. L'examen de 28 échantillons de petit-lait mûri et de 18 échantillons de présures naturelles a démontré qu'il n'en était pas ainsi. La teneur en bactéries propioniques de ces liquides a varié entre 0 et 750 par centimètre cube. Le petit-lait mûri avait une teneur moyenne de 23 et la présure naturelle une teneur moyenne de 150 bactéries propioniques par centimètre cube. Etant donné qu'on ajoute ces présures et cultures à raison d'environ 1‰ au lait de chaudière, il n'en résulte pratiquement aucune modification de la teneur en bactéries propioniques.

Bon nombre de fromagersensemencent leur petit-lait mûri ou leur présure de cultures pures de bactéries propioniques. Sous ces conditions, ces liquides peuvent contenir des quantités considérables de bactéries propioniques. Sur 18 échantillons de présure et de petit-lait mûriensemencés de ferments propioniques que nous avons examinés, 3 (16%) avaient une teneur de plus de 100.000 par centimètre cube (maximum 300.000), 10 (55%) une teneur entre 10.000 et 100.000, 3 (16%) une teneur entre 1.000 et 10.000 et 2 (11%) une teneur inférieure à 500 par centimètre cube. Il est évident que, dans ces derniers échantillons, l'ensemencement était trop faible pour avoir un effet quelconque.

Nous avons cherché à nous rendre compte quel était le sort des bactéries propioniquesensemencées dans la présure en déterminant le nombre de bactéries propioniques ajoutées au début et celui qui subsistait encore dans ce liquide après qu'il s'est acidifié au thermostat en l'espace de 24 et 48 heures. Nous avons constaté que le nombre des bactéries propioniques diminue considérablement au cours de la maturation des présures.

VI. LA TENEUR EN BACTÉRIES PROPIONIQUES DU FROMAGE DE 24 HEURES (*)

La teneur du fromage en bactéries propioniques est la résultante de deux facteurs principaux, à savoir, la teneur du lait emprésuré

(*) Pour plus de détails nous renvoyons à un travail de l'auteur et de M. MOSIMANN dans le *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1939, p. 281.

et la faculté variable des ferments propioniques de survivre à la pasteurisation bénigne qui a lieu durant la fabrication du fromage. Etant donné que la viabilité des bactéries propioniques peut varier grandement, le seul critérium satisfaisant pour savoir si le fromage contient ou non des bactéries propioniques en nombre suffisant est l'analyse du fromage lui-même. Pour obtenir des bases dans cette direction, nous avons analysé, au cours d'une année, 659 échantillons de fromage provenant de 8 fromageries. Une partie de ces fromageries utilisait à peu près régulièrement des cultures pures de ferments propioniques à raison d'une goutte par fromage, soit par 1.000 litres de lait environ. Les autres n'ont employé ces cultures qu'occasionnellement et en quantités bien plus faibles. Le tableau IV donne un aperçu de nos résultats.

TABLEAU IV
TENEUR DU FROMAGE DE 24 HEURES EN BACTÉRIES PROPIONIQUES

Fromagerie N°	Nombre de fromages présentant par g. les teneurs en bactéries propioniques indiquées ci-dessous					Total
	Jusqu'à 60	61-150	151-400	401-2.000	Plus de 2.000	
<i>Premier groupe.</i> — Fromageries utilisant assez régulièrement des cultures de bactéries propioniques.						
1.....	15	14	27	53	75	184
2.....	2	11	13	33	10	69
7 E*.....	4	2	6	10	7	29
6 E*.....	5	6	9	20	4	44
Total	26	33	55	116	96	326
%	8,0	10,1	16,8	35,6	29,5	100,0
<i>Deuxième groupe.</i> — Fromageries dont le fromage est naturellement relativement pauvre en bactéries propioniques.						
4.....	36	24	14	7	0	81
5.....	27	10	28	16	5	86
6 H*.....	9	8	10	1	1	29
Total	72	42	52	24	6	196
%	36,8	21,4	26,5	12,3	3,0	100,0
<i>Troisième groupe.</i> — Fromageries dont le fromage est naturellement relativement riche en bactéries propioniques.						
3.....	14	12	30	27	9	92
8 E*.....	0	1	11	28	5	45
Total	14	13	41	55	14	137
%	10,2	9,5	30,0	40,1	10,2	100,0

* E = Été. H = Hiver.

Il découle du tableau IV que l'ensemencement du lait de chaudière avec une goutte de ferment propionique en culture pure amène dans le fromage une teneur en bactéries propioniques plutôt supérieure à celle que l'on trouve dans les fromages naturellement riches en ferments propioniques. Une teneur de 2-4.000 par gramme de fromage frais doit être considérée comme élevée. D'autre part, un groupe de fromageries présente assez régulièrement des teneurs basses de 100 et moins par gramme et l'on a constaté dans ces cas que les fromages avaient souvent de la peine à développer les trous désirés.

VII. ESSAIS D'UTILISATION DES FERMENTS PROPIONIQUES EN CULTURE PURE POUR LA FABRICATION DU FROMAGE

Technique. — Environ 2.200 kilogrammes de lait sont répartis dans deux chaudières à fromage à l'aide d'une sorte d'entonnoir à deux ouvertures qui assure complète égalité du contenu des deux chaudières. La présure dans les deux chaudières est identique excepté dans les cas où l'on a ajouté les ferments propioniques en préparant celle-ci. Les ferments propioniques ont été additionnés, soit au lait de chaudière directement, soit dans un baquet de lait 12 heures à l'avance, soit enfin à la présure lors de sa préparation. Les quantités utilisées ont varié entre 5 et 1/6^e de goutte (1 goutte = environ 0 cm³ 05). Le nombre des bactéries propioniques contenues par gramme de fromage sortant de presse a été déterminé.

La fabrication a été uniforme dans les deux chaudières. Afin de se rendre compte d'une manière plus précise du volume des trous du fromage, nous avons déterminé son poids spécifique par pesée à sec et sous l'eau tous les 15 jours et nous avons pu suivre ainsi la formation des trous.

Essais d'ensemencement du fromage avec des ferments propioniques. — Influence de la teneur du jeune fromage en ferments propioniques sur le volume des trous.

Il serait fastidieux de donner au complet ici les résultats des 19 paires de fromages d'essais, d'autant plus que nous les avons publiés (*) en détail ailleurs. Nous voulons cependant donner quelques exemples caractéristiques que nous rassemblons au tableau V.

Il découle du tableau V, qu'excepté pour les deux fromages qui ne contenaient que 10 bactéries propioniques par gramme, la teneur en bactéries propioniques du jeune fromage ne semble pas être le facteur dont dépend le volume final des trous du fromage. Ce résultat est confirmé par des expériences faites ultérieurement,

(*) W. DORNER, O. LANGHARD, W. MOSIMANN et P. RITTER. Käsereiversuche mit Propionsäurebakterien. *Schweiz. Milchzeitung*, n° 98, 1938.

TABLEAU V

Date	Chaudière	Ensemencement propionique Gouttes par f.	Teneur du fromage de 24 heures en bactéries propioniques	Poids spécifique du fromage à 3-4 mois	Volume des trous en % du volume total
24 novembre.....	I	1/2	1.400	0,958	13,2
	II	0	10	1,015	7,5
30 novembre.....	I	0	10	1,010	8,0
	II	2	9.400	0,933	15,7
2 décembre	I	1/2	1.600	0,993	9,7
	II	5	16.500	0,990	10,0
13 juin	I	1	1.200	0,895	18,5
	II	0	110	0,894	18,6
19 juin	I	1/6 ^e	170	0,837	25,3
	II	1/6 ^e	300	0,807	28,3
24 juin	I	1/2	200	0,872	21,8
	II	1/2	190	0,898	19,2

dont il ressort que lorsque la teneur du jeune fromage en ferments propioniques dépasse un certain minimum, cette teneur n'influence pas le volume final des trous. Cette teneur minima n'a pas pu être définie d'une manière assez précise. Dans la plupart de nos essais, l'ouverture s'est faite normalement dès que la teneur en bactéries propioniques dépassait 50 ou 80 par gramme. Certaines exceptions nous incitent cependant à la prudence en formulant des chiffres pour la teneur minima en bactéries propioniques nécessaire pour obtenir un volume de trous suffisant.

D'autre part, il n'est pas sans intérêt de constater que, dans nos essais, nous avons trouvé des points bruns dans le fromage dès que la teneur en bactéries propioniques était inférieure à environ 50 par gramme. C'est là une confirmation de la théorie que nous avons émise (1) il y a quelques années sur la genèse de ces points bruns. Lorsque les bactéries propioniques sont en petit nombre dans le fromage, elles forment des colonies brunâtres visibles à l'œil nu, tandis que lorsqu'il y en a beaucoup, les colonies restent assez petites pour qu'on ne les voit pas. Si le volume total des trous qui se forment en trois mois dans le fromage est indépendant de la teneur du fromage en bactéries propioniques, si celle-ci dépasse un certain minimum, la rapidité avec laquelle les trous se forment dépend par contre assez étroitement de cette teneur. La détermina-

(1) W. DORNER et M. THÖNI, *Le Lait*, 1937, p. 568.

tion bimensuelle du poids spécifique du fromage nous a prouvé que plus la teneur du jeune fromage en bactéries propioniques était élevée plus l'ouverture se faisait rapidement. Des recherches de KOESTLER (1) ont démontré que la forme des trous du fromage dépend de la consistance de sa pâte et que celle-ci change pendant la maturation. Etant donné cela, l'époque à laquelle les trous se forment n'est certainement pas indifférente pour la qualité du fromage.

A titre d'exemple, nous reproduisons au graphique I les courbes relatives au poids spécifique d'une paire de fromages faite le 13 juin avec le même lait, mais dont l'un, B, contenait 110 bactéries propioniques au gramme (fromage nonensemencé) et l'autre, A, 1.200 (fromageensemencé d'une goutte de culture).

GRAPHIQUE I
POIDS SPÉCIFIQUE DE DEUX FROMAGES A DIVERSES ÉPOQUES

Légende : A = fromageensemencé de 1 goutte de ferments propioniques.
B = fromage nonensemencé.

Le résultat qui découle du graphique est vraiment frappant. Tandis que les trous commencent à se former péniblement entre 45 et 59 jours pour le fromage nonensemencé, on enregistre pour le fromage qui avait reçu une goutte de culture de ferments propioniques que l'ouverture a commencé à se manifester entre 30 et 45 jours et qu'elle progresse rapidement entre 45 et 59 jours. Elle se ralentit par contre après 73 jours tandis que le fromage nonensemencé continue à fermenter activement. Finalement, les deux pièces ont presque exactement le même poids spécifique lorsqu'elles sont enlevées par le marchand.

(1) G. KOESTLER, *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1932, p. 51.

VIII. LA TENEUR EN BACTÉRIES DE CULTURES PURES DE FERMENTS PROPIONIQUES (1)

Etant donné la grande importance du facteur quantitatif lors de l'ensemencement du lait avec des ferments propioniques (importance qui découle surtout du fait que le fromage est un milieu solide qui retient les bactéries là où elles se trouvent au moment de la coagulation du lait), il nous a paru important d'étudier quelle pouvait être à différents moments la teneur en bactéries des cultures pures s'étant développées à différentes températures.

Nous cultivons les ferments propioniques sur un milieu au petit-lait désalbuminé auquel nous ajoutons 1% de peptone. Le pH du milieu est ajusté à 6,8-7. Les cultures ont été faites dans de grands tubes à essai contenant environ 50 cm³ de milieu, et incubées à 17°, 22° et 30° C. A 17° une partie des cultures ont été faites sous notre bouchon anaérobie parce que les ferments propioniques ne se développaient pas à cette température dans des tubes simplement bouchés à la ouate. Au bout de 10 jours environ les cultures faites à 22° et à 30° ont été placées au laboratoire à 20° environ. De temps en temps, des échantillons des cultures ont été prélevés après agitation convenable et ensemencés en double en dilutions décimales sur un milieu au petit-lait peptoné et gélosé pour déterminer la teneur en bactéries susceptibles de se développer dans ce milieu. Les résultats de ces essais sont représentés au graphique II.

La courbe a représente le développement d'une culture tenue à 22°. La teneur en bactéries augmente relativement lentement de 2 millions un tiers à 15 milliards par centimètre cube en 15 jours, et reste à ce niveau jusqu'au 30^e jour environ. A partir de ce moment, il y a diminution lente d'abord puis plus rapide. Après 175 jours 1 cm³ de culture ne donnait plus de colonies après ensemencement en gélose.

La courbe b représente le développement d'une culture tenue d'abord 10 jours à 30° puis à la température du laboratoire. Ici la teneur en bactéries augmente bien plus vite. Elle passe en 3 jours de 5 millions à 2 milliards pour atteindre un maximum de 3 milliards et demi en 5 jours. Elle reste à ce niveau jusqu'au 9^e jour pour décroître ensuite un peu plus vite que la culture a.

La courbe c représente le développement d'une culture tenue à 17° C. sous bouchon anaérobie. Il en découle qu'à cette température le développement s'arrête à un niveau dix fois plus bas environ que la culture de 30°. Sans bouchon anaérobie à 17° (courbe d), on enregistre une diminution rapide de la teneur en bactéries, sans qu'il y ait multiplication. Il semble que l'énergie vitale des cellules

(1) Voir aussi : W. DORNER et M. THÖNI, *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1936, p. 889.

GRAPHIQUE II

COURBES LOGARITHMIQUES DE LA TENEUR BACTÉRIENNE
DE CULTURES PROPIONIQUES EN PETIT-LAIT PEPTONÉ
INGUBÉES A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES

Légende : a = culture à 22° C.

b = culture tenue 10 jours à 30° C. puis à environ 20°.

c = culture tenue à 17° C. sous bouchon anaérobie.

d = culture tenue à 17° C. sans bouchon anaérobie.

ensemencées n'arrive pas à abaisser la tension d'oxygène dans le milieu à un niveau qui permette à la culture de se développer.

Deux faits importants découlent de ces courbes de croissance. C'est d'une part la constatation de l'arrêt du développement des bactéries propioniques à un niveau bien plus bas lorsque la culture est maintenue à 17°. C'est une parallèle de ce que l'on rencontre en pratique où le fromage de Gruyère qui mûrit entre 15° et 17° forme bien moins d'ouvertures que le fromage d'Emmental que l'on tient dans une cave chaude à 22-25° C. D'autre part, on enregistre à 22° un développement des bactéries propioniques bien plus fort qu'à 30° quoique un peu plus lent qu'à cette température. Cela signifie que la température optima de ces bactéries est réellement plus près de 22° que de 30°.

IX. LA SENSIBILITÉ DES CULTURES PROPIONIQUES D'AGE PHYSIOLOGIQUE DIFFÉRENT AUX EFFETS D'UNE TEMPÉRATURE ÉLEVÉE

Il découle des recherches de SHERMAN (1) et de ses collaborateurs que de jeunes bactéries, c'est-à-dire les cellules d'une culture en

(1) J. M. SHERMAN, C. N. STARK et P. SPARK. *Journal of Dairy Science*, vol. XII, 1929, p. 385.

voie de multiplication rapide sont bien plus sensibles à l'action de la température que les cellules d'une culture au repos. Nous avons cherché à déterminer quelle pouvait être l'influence du principe de Sherman dans l'utilisation des cultures propioniques. A cet effet, nous avons déterminé d'abord quotidiennement puis hebdomadairement la teneur en bactéries de cultures propioniques jusqu'à l'âge de 50 jours. En même temps, nous ensemencions 1 cm³ de la culture dans 10 cm³ de lait cru et nous chauffions le mélange pendant 1 heure à 55° C. Après cette légère pasteurisation le mélange était refroidi, puis on y déterminait les bactéries propioniques survivantes.

Il découle de ces essais que des cultures s'étant développées à 30° ont jusqu'au 10^e jour une sensibilité marquée à la caléfaction. Le nombre des survivants est souvent moins de 10 %. C'est encore pire pour les cultures qui se sont développées à 22°, desquelles à peine 1 % supporte un chauffage à 55° pendant les premiers 10 jours. Ce n'est qu'après 20 jours que la résistance à la chaleur devient normale pour ces cultures. Cette différence provient du fait que les cultures préparées à 22° croissent plus longtemps et restent par conséquent plus jeunes pendant une période plus longue que les cultures faites à 30°. Nos résultats confirment ceux de FRAZIER et WING (1) qui ont imité plus exactement ce qui se passe dans le fromage en chauffant leurs cultures à 53° et en les laissant se refroidir très lentement.

La conclusion pratique à tirer de ces essais est qu'il ne faut pas utiliser des cultures de ferments propioniques trop jeunes et qu'il vaut mieux les cultiver à 30° pour l'emploi en fromagerie.

X. TRANSFORMATION DE BACTÉRIES PROPIONIQUES COCCIFORMES EN BACTÉRIES PROPIONIQUES BACTÉRIFORMES (2)

FRAZIER et WING (3) ont annoncé dans une brève communication la découverte de ferments propioniques en forme de tétracoques, comme étant les agents de l'ouverture du fromage d'Emmental. Nous avons trouvé de notre côté des bactéries probablement identiques à celles que FRAZIER et WING ont signalées et nous nous sommes proposés d'en donner une description plus complète. Au cours de l'étude des souches de tétracoques propioniques, nous avons observé les faits suivants :

1° Quelques mois après l'isolement de plusieurs souches de

(1) FRAZIER et WING. *Journal of Bact.*, vol. XXI, 1931, p. 39.

(2) Voir aussi : W. DORNER et M. THÖNI. *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1939, p. 86.

(3) W. C. FRAZIER et H. U. WING. *Journal of Bact.*, vol. XXIII, 1932, p. 60.

ferments propioniques cocciformes, nous avons observé que les cultures primitivement pures, au moins d'apparence, étaient polluées de microbes bactériiformes.

2° Lors du chauffage à 70° pendant une demie et deux minutes de souches de propionicoques apparemment pures, nous avons constaté que les bactéries survivantes étaient bactériiformes.

Notre première supposition a été que, malgré tous les soins apportés lors de l'isolement, nos cultures étaient impures. Nous avons alors purifié les souches cocciformes et bactériiformes de la culture n° 118 par passages en couche profonde, en partant chaque fois d'une colonie isolée. Après que trois passages successifs eurent été indemnes de colonies de bactéries cocciformes, nous avons fait un ensemencement sur agar penché sous un bouchon anaérobie. Au bout de quelques jours quelques grosses colonies de microcoques se sont développées au milieu de centaines de petites colonies de bâtonnets.

Dès ce moment, nous avons supposé que les bactéries propioniques cocciformes pouvaient se transformer en bactéries propioniques bactériiformes et vice-versa. Nous avons alors cherché à le prouver en isolant par le procédé à l'encre de Chine de BURRI (1) des cultures unicellulaires à partir des souches cocciformes et bactériiformes soigneusement purifiées de la culture n° 118. Le procédé Burri consiste en la préparation à l'aide d'une fine plume à dessin de très petits points à l'encre de Chine préalablement stérilisée et contenant les microbes à isoler en nombre convenable sur une plaque de gélatine nutritive. L'examen microscopique des points à l'encre de Chine démontre si l'un d'eux contient une seule bactérie. On peut alors transporter aseptiquement ce point contenant une seule cellule avec une petite partie de la gélatine sous-jacente dans un milieu approprié. Nous avons utilisé dans ce but un milieu composé comme suit :

- 1 litre de bouillon de viande de cheval.
- 15 grammes de gélose.
- 15 grammes de peptone Witte.
- 15 grammes de peptone pour usage bactériologique Merck.
- 10 grammes d'extrait de levure Difco.
- 12 grammes de lactate de sodium.
- pH-7,0.

Sur 28 points à l'encre de Chine unicellulaires ou bicellulaires, faits à partir de bactéries propioniques cocciformes, 10 se sont

(1) R. BURRI. Das Tuscheverfahren, Jena 1908.

développés. Sur 16 points, contenant chacun un bâtonnet, 5 ont donné des cultures. Nous n'avons suivi qu'une partie de ces cultures et nous avons désigné par C les cultures provenant de formes coccoïdes. La culture C₁ provient d'une seule cellule, les cultures C₂, C₃ et C₄ de deux.

Dès le début, nous avons eu la confirmation cherchée. L'examen microscopique des colonies qui se sont développées à partir des points à l'encre de Chine a démontré que la culture C₁ qui descendait d'une et la culture C₂ qui descendait de deux cellules cocciformes se présentaient comme cultures pures de bâtonnets. La figure 1 représente la souche C₁ à ce moment. Nous avons immédiatement examiné

Fig. 1

Souche K₁. Bâtonnets descendant de la souche de microcoques 118, préparation à la nigrosine à partir d'agar penché.

Grossissement 980 f.

Phot. : Dr W. Staub.

les propriétés physiologiques de nos souches. L'épreuve de fermentation sur les hydrates de carbone et les alcools proposés par ORLA-JENSEN (1) a révélé que les bâtonnets (cultures C₁ et C₂) appartenaient à l'espèce *Propionibacterium Freudenreichii* tandis que les microcoques (cultures C₃ et C₄) présentaient les facultés de fermentation multiples que nous décrivons dans la suite et qui sont typiques pour les propionicoques.

Nous avons ensuite essayé s'il était possible d'obtenir par diverses mesures une retransformation des formes coccoïdes en formes bactéroïdes et vice-versa. A cet effet, les souches à l'étude (C₁ et C₂ formes bactéroïdes descendant de cultures unicellulaires de microcoques, C₃ et C₄ formes coccoïdes descendant de cultures bicellulaires de microcoques) ont étéensemencées, d'une part dans du

(1) S. ORLA-JENSEN. The lactic acid bacteria, Copenhagen, 1919.

petit-lait désalbuminé et peptoné, incubés 13 jours à 30° et conservés ensuite à la température du laboratoire, d'autre part dans du lait incubé à 30° et laissé à cette température. A divers moments, des échantillons de ces cultures ont été prélevés, examinés au microscope et ensemencés en strie anaérobie sur de la gélose au bouillon de viande peptoné. Voici les résultats obtenus :

1. Sur petit-lait peptoné.

Après 13 jours aucune modification.

Après 24 jours aucune modification.

Après 30 jours au microscope, les cultures C_1 et C_2 présentent quelques bâtonnets renflés et rarement des formes coccoïdes à l'extrémité des bâtonnets.

Après 34 jours à l'examen microscopique de C_2 et surtout de C_1 , on voit à côté de bâtonnets normaux de petites chaînettes et de petits groupes de microcoques.

Après 41 jours au microscope mêmes constatations qu'après 34 jours. En culture, les colonies de C_1 et C_2 sont plus compactes qu'auparavant. Les descendants d'une colonie sont examinés quant à leurs facultés de fermenter les substances test d'ORLA-JENSEN. Trois hydrates de carbone qui n'étaient pas attaqués auparavant, le saccharose, le maltose et la dextrine, sont attaqués. Les tubes additionnés de glycérine et de saccharose présentent un anneau à la surface du liquide comme on le voit souvent chez les tétracoques propioniques. Des stries sur gélose à partir de ces tubes ont donné des belles colonies de tétracoques propioniques. *Nous avons là la régression à la forme coccoïde d'origine.* Les colonies provenant de C_3 et C_4 sont inchangées.

Après 55 jours plus de développement après ensemencement d'une anse de culture sur gélose penchée.

2. Sur lait.

Les souches de microcoques C_3 et C_4 ont coagulé le lait en 3 jours, la souche de bâtonnets C_1 en 20 jours, la souche C_2 en 44 jours.

Au bout de 20 *jours*, les stries anaérobies de C_1 donnent des colonies blanches, compactes de bâtonnets renflés mêlés à quelques microcoques. Les stries de C_2 présentent des bâtonnets normaux à côté de bâtonnets moins renflés que ceux de C_1 .

Au bout de 24 *jours*, C_1 se présente en culture comme au bout de 20 jours. La figure 2 est une photographie de la culture à ce moment. A part les substances test acidifiées normalement, la culture C_1 acidifie le raffinose. Il est curieux de constater que bien que la souche C_1 ait coagulé le lait par acidification, elle ne soit pas capable de produire de l'acide aux dépens du lactose dans l'essai de fermenta-

tion. La culture en stries anaérobies de la souche C_2 présente deux grosses colonies de propionicoques à côté d'un grand nombre de

Fig. 2

Souche K_1 , préparation à la nigrosine à partir d'agar penchéensemencé de culture en lait âgée de 24 jours.

Grossissement 980 f.

Phot. : Dr W. Staub,

petites colonies de bâtonnets. La figure 5 est une photo en grandeur naturelle de cette culture. La figure 4 une microphotographie des propionicoques de l'une des grosses colonies de la figure 5.

Les stries anaérobies faites au bout de 28 jours présentent pour C_1 et C_2 des colonies blanches, compactes, contenant des bâtonnets renflés et quelques microcoques. Pas de colonies typiques de propionicoques.

A 35 jours, mêmes constatations qu'au bout de 28 jours.

A 44 jours, C_1 se présente comme précédemment. C_2 par contre donne un agar penché des colonies blanches et compactes contenant surtout de gros microcoques à côté de petits bâtonnets. La figure 3 est une photo d'une préparation faite à ce moment.

La transformation de bâtonnets en microcoques a donc résulté des deux essais. Il est curieux de constater que dans les deux cas c'est la souche C_2 qui provenait à l'origine d'un diplocoque qui s'est retransformée en microcoque après être devenue bâtonnet au moment de l'isolement par le procédé Burri. La retransformation complète de la souche C_1 , par contre, n'a pas pu être obtenue bien qu'elle en ait présenté à certains moments des signes évidents.

Ces expériences démontrent nettement que la transformation de cultures de propionicoques en propionibactéries est réelle. Ce n'est pas un phénomène factice, dû à des cultures impures. Nous l'avons observé sur 5 souches de propionicoques sur 45 que nous

avons suivies pendant plus d'une année. Il est curieux de noter qu'à partir de souches de propionicoques apparemment identiques, on obtient, soit *Propionibact. Shermanii*, soit *Propionibact. Freudenreichii*.

Fig. 3

Souche K₂, préparation à la nigrosine à partir d'agar penché ensemencé de culture en lait âgée de 44 jours.

Grossissement 980 f.

Phot. : Dr W. Staub.

XI. DESCRIPTION DES BACTÉRIES PROPIONIQUES COCCIFORMES

a) **Les méthodes** utilisées dans ce travail ont été décrites plus

Fig. 4

Souche K₂, microcoques propioniques, préparation à la nigrosine à partir d'une grosse colonie sur agar penché représenté à la fig. 5.

Grossissement 980 f.

Phot. : Dr W. Staub.

en détail lors d'un travail précédent (1). Nous avons examiné 45 souches de propionicoques qui étaient, à l'exception d'une seule, isolées à partir du lait.

b) **Morphologie microscopique.** — Les propionicoques sont des tétra- et diplocoques typiques. Ils ne sont donc pas entièrement sphériques. La figure 4 en donne une image. Les dimensions de 4 souches mesurées sur des préparations à la nigrosine sont indiquées au tableau VI.

Fig. 5

Culture sur agar penché à partir de laitensemencé depuis 24 jours avec la souche K₂. On remarque 2 grosses colonies de microcoques propioniques à côté d'innombrables petites colonies de bactéries propioniques.

Grandeur naturelle.

Phot. : Dr W. Staub.

Dimensions de 4 souches de propionicoques.

Il découle du tableau VI que les propionicoques sont des microbes relativement grands d'un diamètre moyen d'environ 1 1/4. Nous les avons toujours vus immobiles et dépourvus de spores. Ils prennent le Gram. Quelques cellules par préparation seulement sont négatives à ce point de vue.

c) **Températures de croissance.** — Sur 45 souches 30 avaient une température optima de 30°, 8 de 30° à 37°, 6 de 37° et une de 20° à 30°. La température optima de la majorité des propionicoques est donc de 30°.

Sur 44 souches 21 avaient une température maxima de 42°.

(1) W. DORNER et M. THÖNI. *Landw. Jahrbuch der Schweiz*, 1937, p. 437.

TABLEAU VI

Souches	Dimensions	Moyenne en μ (1)	Dévi- ation standard	Relation long.-larg.
PM 17	longueur	1,76	0,37	1,30 : 1
	largeur	1,35	0,27	
PM 5.	longueur	1,26	0,33	1,28 : 1
	largeur	0,98	0,20	
PL 5	longueur	1,49	0,37	1,36 : 1
	largeur	1,09	0,25	
PM 1	longueur	1,38	0,26	1,31 : 1
	largeur	1,05	0,18	

(1) μ lettre grecque " mu " = p.

19 de 46°, 1 de 50° et 4 de 37°. On peut donc admettre que la grande majorité de nos souches ont un maximum de température de 45° environ. La température minima n'a pas pu être déterminée.

d) **pH optimal, maximal et minimal.** — Le pH optimal des propionicoques est d'environ 6,9. Le pH maximal de 8 et plus. 18 souches ont présenté un pH minimal de moins de 5, 16 de 5,0 à 5,3. Il est fort probable que ces dernières souches ne seraient guère capables de provoquer des trous dans du fromage normal.

e) **Morphologie macroscopique.** — Les propionicoques se développent sur tous les milieux de culture usuels. Ils poussent plutôt lentement à peu près comme les propionibactéries.

Développement sur agar penché. Les propionicoques forment un abondant gazon formé de colonies individuelles de couleur jaune à orange foncé. A l'abri de l'air, la couleur est un peu plus claire. Ils se développent à peine moins bien au contact de l'air qu'anaérobiquement. Les colonies peuvent atteindre un diamètre de 9 millimètres. Elles sont dans la règle circulaires, lisses, tendres, légèrement bombées et à bords entiers. Quelquefois, surtout en cultures aérobies, elles sont mates, plus fortement surélevées et de consistance granuleuse (forme r).

Développement en couche profonde. En couche profonde les colonies se forment jusqu'à la surface du milieu. Elles sont lenticulaires ou ailées, et peuvent atteindre quelques millimètres de diamètre. De temps en temps, on rencontre des colonies coriaces

et tuberculeuses comme elles ont été décrites par STAUB (1) pour les ferments propioniques bactériiformes.

Développement en milieux liquides. Les propionicoques se développent activement en bouillon et en petit-lait peptoné. Ils troublent ces milieux et forment un dépôt au bout de quelques jours. Il se forme un anneau jaunâtre autour du verre à la surface du liquide.

Développement en piqûres. Les propionicoques se développent tout le long de la piqûre, sans ramification. La gélose se fend souvent pour faire place à la quantité de microbes qui se développent.

Comportement vis-à-vis de l'oxygène. Il découle du développement sous les différentes formes de culture que les propionicoques sont beaucoup moins anaérobies que les propionibactéries. On peut les désigner d'anaérobies facultatifs.

f) Physiologie.

Comportement en lait. Les propionicoques coagulent dans la règle le lait. Deux de nos souches l'ont fait cailler en un, 2 en 2, 8 en 3, 8 en 4-5, 17 en 6-10 jours. Les 8 souches restantes ne l'ont pas coagulé ou l'ont fait cailler dans un temps beaucoup plus long. La coagulation s'est faite par acidification.

Nos souches ont formé en 10 jours entre 2 et 10 cm³ d'acide décinormal dans 10 cm³ de lait. Ils produisent aussi des acides volatils. Les 10 premiers centimètres cubes qui ont passé, à la distillation de 50 cm³ de culture en lait âgée de 10 jours, ont nécessité environ entre plus de 2 et 0 cm³ 2 de soude décinormale pour être neutralisés. Sous ces conditions les trois quarts des souches ont nécessité plus de 1 cm³ de soude décinormale.

Fermentation du lactate de soude. Toutes nos souches ont transformé du lactate de soude en acides propionique, acétique et carbonique. La détermination des acides formés a été faite selon DUCLAUX pour toutes les souches. Pour plus de sûreté, nous avons déterminé sur quelques-unes la teneur en argent des sels d'argent formés avec les acides. Il en est résulté qu'il s'agit vraiment d'acide propionique et acétique. Les premières fractions selon DUCLAUX semblent contenir aussi de petites quantités d'acide formique.

La proportion d'acide propionique et d'acide acétique formés a été de 2:1 pour 22 souches, de 1-2:1 pour 5, de 2-3:1 pour 7, de 3-4:1 pour 8, de 5:1 pour 1 souche. Deux souches ont formé de l'acide propionique presque pur. La *gélatine* n'a jamais été liquéfiée par nos souches. Celles-ci n'ont pas formé d'*indol*.

La moitié de nos souches ont donné une *réaction de Voges-*

(1) W. STAUB. Volume jubilaire pour le Professeur BURRI. Edition Schweiz. Milchzeitung, Schaffhausen, 1937, p. 90.

Proskauer faiblement positive. Elles forment donc de l'acétyl-méthyle-carbinol à partir du glucose. La plupart de ces souches ont également donné de l'acétone sur un milieu au citrate de soude.

Douze de nos souches ont réduit faiblement des *nitrites* en *nitrites* et toutes contiennent de la *catalase*.

Fermentation d'hydrates de carbone, d'alcools et de glucosides.

Contrairement aux bactéries propioniques, les propionicoques sont doués d'un pouvoir fermentatif très étendu. Les substances suivantes ont été acidifiées fortement par toutes nos 45 souches : glycérine, lévulose, dextrose, mannose, galactose, saccharose, maltose et lactose. 44 souches ont attaqué la dextrine, 43 la sorbite, 42 la mannite, la raffinose et la salicine, 35 l'inuline, 32 l'amidon, 28 l'arabinose et 5 l'isodulcite. Aucune souche n'a attaqué le xylose.

g) **Résistance à la chaleur.** — La résistance à la caléfaction des quelques souches éprouvées est faible. Elles ne supportent pas un chauffage à 70° C. pendant 30 secondes. Les propionicoques sont donc plus sensibles aux hautes températures que ne le sont les propionibactéries. Ce fait n'est pas sans importance dans la technique fromagère.

Conclusions

Nous ne voulons pas discuter ici des conséquences qu'a dans le domaine de la systématique la preuve de la transformation des propionicoques en propionibactéries et vice-versa. Ce n'est du reste pas la première fois que des transformations de ce genre sont signalées. Cette découverte nous enlève cependant la possibilité de donner un nom aux tétracoques que nous avons décrits d'une manière assez complète pour la première fois.

DOSAGE DE LA MATIÈRE GRASSE DANS LES FROMAGES

par

HENRI COUTURIER

Directeur des Laboratoires des Fromageries Bel

Depuis deux ans, et sans doute parce que le décret d'octobre 1936 a remis la question à l'ordre du jour, on a pu lire dans « Le Lait », comme d'ailleurs dans toute la presse professionnelle, un certain nombre d'articles consacrés à la technique du dosage de la matière grasse dans les fromages. Des chimistes compétents y soutiennent, sans aucune arrière-pensée, des points de vue parfois divers, sinon contradictoires. Et cela serait fort bien si leur argumentation était