LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

Mémoires originaux :

G. GUILLOT, A. NÉVOT et
G. THIEULIN. — Recher-
che, dans le lait en nature,
de certaines bactéries pa-
thogènes pour l'homme . 337

CH. ALLAIS. — Isolement de
ferments lactiques particu-
liers au lait de brebis et au
fromage de Roquefort . . 349

E. LEMETAYER, L. NICOL,
O. GIRARD, R. CORVAZIER
et M. CHEYROUX. — Le
colostrum et le lait dans
leurs rapports avec l'im-
munité du jeune 359

Revue :

G. GÉNIN. — L'industrie lai-
tière dans le monde . . . 373

Bibliographie analytique :

1^o Les livres 382

2^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 389
3^o Brevets 432

Bulletin bibliographique :

1^o Journaux, Revues, Sociétés
savantes 435
2^o Brevets 441

XII^e Congrès international de Laiterie

Stockholm (août 1949) :

G. E. HOLM. — Les processus
d'oxydation dans le lait et
les produits laitiers . . . 443

E. CAPSTICK. — Technique de
conservation des fromages 457

Documents et informations :

Communiqué 464
Erratum 464

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

RECHERCHE, DANS LE LAIT EN NATURE DE CERTAINES BACTÉRIES PATHOGÈNES POUR L'HOMME

par

G. GUILLOT, A. NÉVOT et G. THIEULIN

La détection des bactéries pathogènes dans le lait et les produits laitiers pose des problèmes complexes d'ordre scientifique et technique ; il importe, entre autres objectifs, d'adopter des méthodes éprouvées dont l'emploi et l'interprétation, quant à leurs résultats, soient sans ambiguïté.

Aussi, nous sommes-nous d'abord proposé de donner des méthodes de recherche pour le lait en nature et, dans ce cas, de rechercher les bactéries pathogènes suivantes :

Bacille de la tuberculose et Brucella, bacilles typhiques et paratyphiques, streptocoques et staphylocoques.

1) Reproduction interdite sans indication de source,

A. RECHERCHE DU BACILLE TUBERCULEUX ET DES BRUCELLA

La recherche du bacille tuberculeux et des *Brucella* est essentiellement basée sur l'inoculation aux cobayes.

La recherche du bacille tuberculeux pourra, dans des conditions particulières, être réalisée par examen microscopique direct ; celle des *Brucella*, par les méthodes d'agglutination. Dans ces deux cas, les conclusions obtenues ne permettront que des présomptions, cependant utilisables.

I. Inoculation aux cobayes

Quantité de lait nécessaire : 20 cm³ au moins (recueillis aseptiquement).

Réactifs et matériel :

Tuberculine brute diluée au 1/10.

2 cobayes (pesant chacun 250 à 300 grammes).

2 seringues, l'une de 1 ml., graduée au 1/10 et l'autre de 5 ml.

2 aiguilles de 3 cm. de longueur environ ; l'une pour inoculation (8/10), l'autre pour intra-dermo-réaction (4/10).

2 tubes à centrifugation (25 ml environ) stériles.

Principe.

Le cobaye est un animal réceptif à l'infection tuberculeuse (*Mycobacterium tuberculosis*) — type humain ou type bovin — et à l'infection brucellique (*Brucella abortus*, *B. melitensis* ou *B. suis*).

Lorsque ces germes spécifiques existent dans le lait, ils se réunissent surtout dans le culot de centrifugation et dans la crème. L'inoculation de ce matériel pourra provoquer chez le cobaye l'infection correspondante, dont les caractères permettront l'identification dans un délai de un à trois mois.

Les recherches du bacille tuberculeux et des *Brucella* ne sont, en principe, effectuées que sur des laits individuels, des laits d'étable et des laits de pasteurisation incertaine.

Dans ces conditions, les laits soumis aux examens sont peu souillés de germes banaux et il est inutile de leur faire subir un traitement visant à les débarrasser de leur flore non spécifique (traitements à l'acide sulfurique et à la soude...).

La méthode permet de rechercher simultanément, dans un même lait, le bacille tuberculeux et les *Brucella*.

Pour se prémunir contre les risques de mort accidentelle, on inocule deux cobayes.

Technique.

A l'aide d'une pipette stérile, introduire aseptiquement 10 cm³ au moins de lait, respectivement, dans deux tubes à centrifugation, parfaitement propres et stériles. Centrifuger 20 minutes à 3.000 tours/minute, environ, ce qui permet l'obtention d'un anneau de crème bien séparé.

Après centrifugation, pour chaque tube :

A l'aide d'un fil de platine flambé, décoller l'anneau de crème sur environ la moitié de son pourtour. Par l'ouverture ainsi créée, faire écouler hors du tube le lait écrémé, puis mélanger la crème et le culot au liquide restant dans le tube de façon à obtenir un mélange homogène d'un volume de 2 cm³ environ, au maximum.

Prélever ce mélange dans la seringue de 5 ml., préalablement stérilisée (15 minutes dans l'eau bouillante) et refroidie.

Inoculer la totalité du contenu de chacun des tubes à un cobaye dans le tissu conjonctif sous-cutané (région ombilicale, ou face interne de la cuisse) après désinfection de la région à l'alcool à 95°.

Isoler les deux cobayes inoculés dans une seule cage ou dans deux cages individuelles étiquetées.

Rechercher, sur chaque cobaye, les signes d'infection de la façon suivante :

1. Vers le trentième jour, après inoculation, ou, antérieurement, dès l'apparition d'une réaction ganglionnaire.

a) *Infection tuberculeuse :*

L'infection tuberculeuse sera caractérisée à l'aide d'une tuberculination par intra-dermo-réaction.

Pour ce faire :

Epiler, par arrachement, une surface de 3 à 4 cm. de diamètre de la peau du flanc et injecter, dans l'épaisseur du derme, 0 cm³ 1 d'une dilution au 1/10 de tuberculine brute.

Observer la réaction au cours des quarante-huit heures consécutives.

Une réaction positive est caractérisée soit par une macule (parfois une papule) — infiltration œdémateuse du derme, d'un diamètre de 1 à 2 cm. avec coloration rouge violacé persistant trente-six à quarante-huit heures — soit par une exulcération pouvant même être nécrotique.

Dans le cas d'une réaction positive légère, une seconde intra-dermo-réaction sera pratiquée huit jours plus tard sur le flanc opposé ;

b) *Infection brucellique :*

L'infection brucellique sera reconnue par une séro-agglutination

spécifique effectuée à l'aide du sang de l'un des cobayes, recueilli par ponction du cœur :

L'animal, étant fixé sur le dos, les membres en extension (les antérieurs perpendiculairement à l'axe du corps), la tête bien maintenue, épiler à la main et aseptiser à l'alcool à 95° la région précordiale.

Repérer avec l'index (passé à l'alcool) sur le thorax, le point où les battements cardiaques sont perçus avec le maximum d'intensité : y enfoncer d'un coup brusque à 15-18 mm. de profondeur et perpendiculairement à la surface cutanée, l'aiguille montée ou non sur la seringue (aiguille et seringue préalablement stérilisées). L'aiguille ayant pénétré dans le cœur, aspirer lentement 3 à 5 cm³ de sang, puis retirer rapidement l'aiguille.

Généralement le cobaye supporte bien la ponction. Pour plus de sécurité, on pourra lui injecter immédiatement sous la peau 5 à 10 cm³ de sérum physiologique bouilli et tiédi.

Projeter le sang recueilli dans un tube stérile. Après sa coagulation, au bout de quelques minutes, décoller le caillot à l'aide d'une pipette Pasteur fermée et stérile. Placer à l'étuve à 37° jusqu'à obtention d'une quantité suffisante de sérum (une à trois heures). Si le sérum n'est pas limpide, le clarifier par centrifugation.

À l'aide d'une pipette stérile de 1 ml., divisée en 0 ml. 1, prélever la quantité de sérum nécessaire (0 cm³ 2) pour effectuer une séro-agglutination, suivant la technique ci-après : (III. Recherche de l'infection brucellique par lacto- et séro-agglutination).

La réaction sera considérée comme positive lorsque le sérum agglutinera à une dilution supérieure ou égale au 1/40.

2. Si l'une ou les deux réactions précédentes (intra-dermo-réaction et séro-agglutination) sont négatives ou douteuses, les renouveler vers le soixantième jour après inoculation.

3. Si, pour la seconde fois, l'une ou les deux réactions sont négatives ou douteuses, sacrifier l'animal vers le quatre-vingt-dixième jour.

Faire l'autopsie et rechercher les lésions caractéristiques de ces infections (cette autopsie sera également faite en cas de mort accidentelle des animaux) :

a) *Infection tuberculeuse* :

1. Nodule induré, abcès ou ulcère au point d'inoculation.
2. Hypertrophie ganglionnaire (ganglions correspondant au point d'inoculation et ganglions éloignés), avec induration, caséification ou calcification.
3. Lésions de la rate et du foie (hypertrophie, présence de tubercules plus ou moins caséeux).

4. Amaigrissement de l'animal, cachexie.

Dans le cas de lésions douteuses, tenter de mettre en évidence, les bacilles spécifiques dans les masses ganglionnaires et les tubercules, en effectuant des examens microscopiques de frottis colorés, selon la méthode de Ziehl (technique ci-après : II. Recherche du bacille tuberculeux par examen microscopique);

b) *Infection brucellique* :

Le signe essentiel est l'hypertrophie de la rate.

On pourra éventuellement rechercher les *Brucella* par culture (broyage de la rate, ensemencement sur milieux spéciaux...).

Interprétation.

Pour chaque cobaye inoculé :

a) *Infection tuberculeuse* :

L'inoculation sera considérée comme positive dans les deux cas suivants :

1. A la suite d'une tuberculation nettement positive.

2. En cas de tuberculation négative ou douteuse, lorsque l'on constate, à l'autopsie, des lésions macroscopiquement positives ou contrôlées par des frottis positifs.

Dans tous les autres cas, l'inoculation sera considérée comme négative ;

b) *Infection brucellique* :

L'inoculation sera considérée comme positive à la suite d'une séro-agglutination positive à une dilution supérieure ou égale au 1/40.

Si les deux séro-agglutinations ont été négatives à ce taux de dilution, l'hypertrophie de la rate ne peut à elle seule caractériser l'infection et il y aurait lieu de contrôler l'origine de cette lésion par une culture de *Brucella*, mais une telle culture est délicate et ne saurait entrer dans le cadre de cet exposé. Dans ce cas, on se contentera de considérer l'inoculation comme douteuse.

Dans tous les autres cas, l'inoculation sera considérée comme négative.

Les tableaux suivants résument ce qui précède :

a) *Infection tuberculeuse* :

Première ou deuxième tuberculation	Lésions	Conclusion : Inoculation au cobaye
+		+
? ou —	+	+
? ou —	? ou —	—

b) *Infection brucellique* :

Première ou deuxième séro-agglutination positive	Lésions (splénomégalie)	Conclusion : Inoculation au cobaye
$\geq 1/40$		+
$< 1/40$	+	?
$< 1/40$	—	—

(+ : Résultat positif ; ? : résultat douteux ; — : résultat négatif.)

II. Recherche du bacille tuberculeux par examen microscopique

Quantité de lait nécessaire : 10 cm au moins (lait individuel, recueilli par traite septique).

Réactifs et matériel :

Alcool à 95°.

Fuchsine phéniquée de Ziehl.

Acide nitrique au 1/3 ou acide sulfurique au 1/4.

Bleu de méthylène phéniqué.

Xylol.

1 tube à centrifugation.

Principe.

Le bacille tuberculeux est acido-alcool-résistant, visible au microscope après coloration par la méthode de Ziehl.

On pourra ainsi le rechercher directement dans un lait individuel, recueilli à la mamelle, et soumis à la centrifugation qui rassemble les bacilles dans la crème et dans le culot.

Technique.

A l'aide d'une pipette stérile, introduire aseptiquement environ 10 cm³ du lait à analyser, dans un tube à centrifugation parfaitement propre et stérile. Centrifuger 20 minutes à 3.000 tours/minute.

Faire d'abord au moins deux frottis avec un peu de crème prélevée à l'aide d'une anse métallique flambée.

Avec le même fil métallique, décoller circulairement l'anneau de crème et renverser brusquement le contenu du tube : le culot reste adhérent. Mélanger ce culot avec la petite quantité de liquide restée dans le tube, prélever un peu du mélange et faire au moins deux frottis.

Si ces frottis se révèlent trop épais, réaliser une dilution dans une goutte d'eau déposée sur une lame porte-objet.

Sécher toutes les préparations par agitation dans l'air ou à l'étuve, puis fixer par l'alcool à 95° pendant cinq minutes. Les frottis

obtenus avec la crème seront, avant fixation, dégraissés au xylol pendant cinq minutes environ. Colorer enfin toutes les préparations par la méthode de Ziehl, et examiner au microscope à l'objectif à immersion.

Méthode de Ziehl.

Après fixation, les lames sont horizontalement placées sur un support métallique. Verser le colorant (fuchsine basique : 5 gr. ; alcool à 95° : 50 cm³ ; acide phénique : 25 gr. ; eau distillée : 450 cm³) ; chauffer jusqu'à émission de vapeurs sans ébullition et maintenir pendant dix minutes. Laver à l'eau, décolorer (deux minutes) à l'aide d'acide nitrique au 1/3 ou d'acide sulfurique au 1/4, laver à l'eau, laver à l'alcool à 95° (cinq minutes), laver à l'eau, colorer au bleu de méthylène (solution aqueuse à 1%) (trente secondes), laver à l'eau, sécher.

Interprétation.

La découverte de bacilles acido-alcool-résistants (fins ou gros, homogènes ou granuleux), sans permettre d'affirmer qu'il s'agit de bacilles tuberculeux, peut cependant conduire à une très forte présomption, si le lait a été recueilli par traite aseptique.

III. Recherche de l'infection brucellique par lacto- et séro-agglutination

Quantité de lait nécessaire (lait individuel recueilli par traite aseptique) ou de sang : 5 cm³.

Réactifs et matériel :

Eau stérile, salée à 8,5 p. 1.000.

Suspension d'antigène (*Brucella abortus*) (1).

7 tubes à hémolyse.

2 Pipettes de 1 ml. divisées en 0,1.

Principe.

Dans un organisme infecté par une *Brucella*, apparaissent rapidement dans le sérum sanguin des anticorps spécifiques.

Les anticorps brucelliques du lait ou du sérum sanguin sont susceptibles de provoquer l'agglutination (lacto- ou séro-agglutination) d'une suspension d'antigène correspondant. En particulier, une suspension de *B. abortus* (dont la culture et la récolte sont peu dan-

(1) Suspension d'éléments microbiens tués par la chaleur. Se procurer cette suspension d'antigène dans un laboratoire spécialisé (par exemple, en France : Centre National de Recherches pour la fièvre ondulante à Montpellier (Hérault) ; Laboratoire National des Recherches vétérinaires à Alfort (Seine). Le Laboratoire fournisseur indiquera éventuellement la dilution à effectuer.

gereuses) sera agglutinée à la fois par les anticorps dus à *B. abortus*, *B. melitensis* et *B. suis* (agglutination de groupe).

On déterminera l'intensité de cette agglutination en cherchant jusqu'à quel taux de dilution du lacto-sérum ou du sérum sanguin elle est encore perceptible. La connaissance de ce taux permettra de conclure, suivant les cas, à l'absence ou à la présence possible des *Brucella* dans le lait.

La lacto-agglutination n'est une épreuve intéressante à pratiquer que dans le seul cas où l'on dispose de lait individuel recueilli par traite aseptique.

Technique.

Le lacto-sérum est obtenu par coagulation, dans un tube stérile, de 5 ml. environ du lait à analyser, par une goutte de présure commerciale (titrant 1 p. 10.000).

Le sérum sanguin sera obtenu par coagulation spontanée, dans un tube stérile, de 5 à 10 cm³ de sang, prélevés aseptiquement chez la vache laitière par ponction veineuse.

Au bout de quelques minutes, décoller le caillot à l'aide d'une pipette Pasteur, fermée, stérile et placer à l'étuve à 37° pendant une ou deux heures, jusqu'à obtention d'une quantité suffisante de sérum.

S'il est nécessaire, clarifier ensuite le lacto-sérum ou le sérum sanguin par centrifugation.

Sur chaque liquide limpide ainsi obtenu, rechercher le pouvoir agglutinant en appliquant la technique suivante :

Disposer sur un support 7 tubes à hémolyse, puis, à l'aide d'une pipette stérile, divisée en 0 ml. 1, introduire :

Dans le tube n° 1 : 0 cm³ 8 d'eau salée stérile ;

Dans les tubes suivants (2 à 7) : 0 cm³ 5 de la même eau.

A l'aide d'une pipette analogue, prélever 0 cm³ 2 du liquide à étudier (lacto-sérum ou sérum sanguin) et les introduire dans le tube n° 1. Mélanger par aspiration et refoulement à la pipette. Transporter ensuite 0 cm³ 5 de ce mélange dans le tube n° 2 ; mélanger ; transporter à nouveau 0 cm³ 5 de ce tube n° 2, dans le tube n° 3 et ainsi de suite jusqu'au tube n° 6 inclus dont on rejettera ensuite 0 cm³ 5 du mélange qu'il contiendra.

Introduire alors, dans chacun des 7 tubes, 0 cm³ 5 de la suspension d'antigène, en mélangeant chaque fois par agitation du tube.

Les dilutions (de lacto-sérum ou de sérum sanguin) finalement obtenues sont respectivement, pour les 6 premiers tubes, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 et 1/320. Le 7^e tube (tube témoin) ne renferme que de l'eau salée et de l'antigène.

Les 7 tubes présentent alors un aspect opaslescent.

Les placer à l'étuve à 37° pendant 12 heures environ (une nuit), puis les sortir et les laisser au repos, environ 24 heures, à la température du laboratoire.

Au bout de ce temps :

Vérifier que l'agglutination est négative dans le tube témoin. Si elle est positive, la suspension microbienne est auto-agglutinable et la réaction est sans valeur. Recommencer avec une autre suspension d'antigène.

L'agglutination sera considérée comme positive, dans un tube, lorsqu'il se sera formé des agglutinats nets, visibles à l'œil nu, ou au miroir concave, avec liquide surnageant limpide ou légèrement opalescent.

Dans tous les autres cas, l'agglutination sera considérée comme négative.

Interprétation.

Le taux d'agglutination est défini par la dilution la plus grande des tubes à agglutination positive.

Par exemple, si l'agglutination est positive dans les tubes n° 1 (dilution au 1/10), n° 2 (1/20) et n° 3 (1/40) et négative dans tous les autres, on dira que le sérum examiné agglutine au 1/40.

Une lacto-agglutination égale ou supérieure au 1/80 laisse supposer l'infection brucelique du lait. Si elle est inférieure au 1/80, seule une séro-agglutination égale ou supérieure au 1/320 permet de conclure à l'infection brucelique.

En fait, *Brucella* n'est pas rencontrée dans les laits dont le lacto-sérum agglutine à une dilution inférieure ou égale au 1/20.

D'une manière générale, seule l'inoculation positive au cobaye conduit à une conclusion catégorique.

B. RECHERCHE DES BACILLES TYPHIQUE ET PARATYPHIQUE

Quantité de lait nécessaire : 20 cm³ (recueillis aseptiquement).

Milieux de culture (1) et matériel :

1 tube de milieu « Muller-Kauffmann ».

2 tubes de milieu « Kristensen-Kauffmann ».

1 tube d'eau peptonée.

1 tube d'eau peptonée lactosée additionnée d'un indicateur de pH.

1 tube de gélose au rouge neutre.

1 tube de gélose au sous-acétate de plomb.

2 tubes à centrifugation.

(1) Les formules de préparation sont indiquées ci-après.

Principe.

Les bacilles typhiques (*Salmonella typhi* = *Eberthella typhosa*) et paratyphiques (*Salmonella paratyphi* A. B. C....) sont mobiles et ne prennent pas la coloration de Gram ; ils cultivent bien en milieu (de Muller-Kauffmann) contenant du vert brillant et de la bile, tandis que ces éléments gênent la croissance d'autres germes. Enfin, sur milieu solide lactosé au rouge de phénol (de Kristensen-Kauffmann), ils forment des colonies rouges, tandis que celles d'autres germes mobiles et également Gram négatifs sont vertes (*Escherichia coli*), jaunâtres ou roses (*Proteus*...) ou d'aspect différent (colonies muqueuses).

Ces deux milieux d'enrichissement et d'isolement permettent d'obtenir rapidement une culture pure qui sera identifiée par la méthode classique faisant apparaître les caractères essentiels des germes recherchés.

Technique.

A l'aide d'une pipette stérile, introduire aseptiquement 10 à 20 cm³ de lait dans un ou deux tubes à centrifugation. Centrifuger 20 minutes à 3.000 tours. Après centrifugation, à l'aide du fil métallique flambé, décoller l'anneau de crème sur environ la moitié de son pourtour. Par l'ouverture ainsi créée, faire écouler hors du tube le lait écrémé, puis mélanger la crème et le culot de façon à obtenir un mélange homogène. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, ensemercer avec environ 2 cm³ de ce mélange un tube contenant le milieu d'enrichissement de Muller-Kauffmann (1).

Porter à l'étuve à 37°.

Après 24 heures, faire un examen microscopique direct de la culture. A l'état frais, entre lame et lamelle, rechercher la flore mobile ; sur un frottis, rechercher la flore à Gram négatif.

Si une telle flore, présentant ce double caractère apparaît, bien que le milieu d'enrichissement atténue parfois la mobilité des bactéries, ensemercer en stries, pour isolement, une goutte de cette culture sur milieu sélectif de Kristensen-Kauffmann en boîte de Pétri. Après vingt-quatre heures, rechercher une colonie rouge bien isolée. La prélever, la dissocier en eau salée stérile, et, à partir de cette suspension, procéder, pour purification, à un nouvel isolement sur milieu de Kristensen-Kauffmann.

Après vingt-quatre heures d'étuve à 37°, prélever une colonie rouge isolée, la dissocier en eau salée stérile.

A partir de cette suspension, ensemercer (quelques gouttes) : un tube d'eau peptonée, un tube d'eau peptonée lactosée addition-

(1) Le milieu de Leifson, au sélénite de soude, convient également pour cet enrichissement.

née d'un indicateur de pH , un tube de gélose au rouge neutre (en culot) préalablement fondue et, par piquûre, entre le milieu et la paroi, un tube de gélose au sous-acétate de plomb (en culot).

Porter à l'étuve à 37° .

Après vingt-quatre heures : rechercher la formation d'indol dans l'eau peptonée, observer le virage des milieux lactosé et au rouge neutre, et le noircissement de la gélose au plomb.

Le résultat sera interprété selon les indications portées dans le tableau suivant :

	Eau peptonée	Eau peptonée lactosée	Gélose au rouge neutre	Gélose au sous- acétate de plomb
Bacille typhique	Absence d'indol	Pas de virage	Pas de virage	Noircissement
Bacille paratyphi- que A.	Absence d'indol	Pas de virage	Virage	Pas de noircissement
Bacille paratyphi- que B.	Absence d'indol	Pas de virage	Virage et fluorescence	Noircissement
Bacille paratyphi- que C.	Absence d'indol	Pas de virage	Virage irrégulier	Noircissement

Observation.

De nombreuses *Salmonella* (*S. enteritidis* = B. de Gärtner, *S. typhi murium* = *S. Aertrycke*...), présentent les réactions biochimiques élémentaires du bacille paratyphique B ; leur distinction ne peut être faite que par l'emploi d'autres réactions biochimiques particulières et par des méthodes sérologiques nécessitant la possession de sérums agglutinants expérimentaux.

Formule de préparation des milieux de culture préconisés

I. Milieu de « Muller-Kauffmann ».

Carbonate de calcium	22,5	gr.
Bouillon nutritif ($pH = 7,4$)	450	cm ³
(Viande de bœuf 500 gr. ; peptone 15 gr. ; chlorure de sodium 5 gr. ; eau 1.000 cm ³)		
Solution iodo-iodurée	10	cm ³
(Iodure de potassium 25 gr. ; eau distillée 100 cm ³ ; iode 20 gr.)		
Solution de thiosulfate (hyposulfite) de soude à 50 %	50	cm ³
Solution de vert brillant à 1 %	5	cm ³
Bile	25	cm ³

Le thiosulfate est facilement soluble dans l'eau chaude, le vert brillant également ; cependant, il convient de préparer la solution

de ce dernier, vingt-quatre heures à l'avance (solution stable).

Les tétrathionates prennent naissance lorsqu'on fait agir les hyposulfites sur l'iode.

Recueillir aseptiquement de la bile (bœuf, lapin...) dans un récipient et la traiter à la vapeur fluente (100°) deux fois pendant quarante minutes, à vingt-quatre heures d'intervalle.

Dans un ballon d'un demi-litre, mettre le bouillon et le carbonate de calcium ; bien mélanger. Stériliser une demi-heure à la vapeur fluente, ajouter d'abord la solution iodo-iodurée, puis celle de thio-sulfate de soude, puis celle de vert brillant, enfin la bile. Après chaque addition, bien remuer. Répartir en tubes à essais 6 à 8 cm³ du mélange par tube ; bien remuer pendant toute la répartition pour éviter le dépôt de carbonate de calcium. Stériliser pendant quarante minutes à la valeur fluente.

2. Milieu de « Kristensen-Kauffmann ».

Bouillon nutritif (formule précédente)	100	cm ³
Gélose	2,5	gr.
(pH non ajusté.)		

Stériliser 20 minutes à 120°. Ajouter :

Solution de lactose à 20 %	5	cm ³
----------------------------------	---	-----------------

Filtrer. Stériliser 20 minutes à 115°. Ajouter :

Solution de rouge de phénol (soude N/10 : 40 cm ³ ; rouge de phénol : 1 gr. ; eau distillée : 460 cm ³)	4	cm ³
Solution de vert brillant à 0,5 %	0,15	cm ³

Le milieu ainsi préparé doit avoir une teinte brun verdâtre. Pour juger de la teinte, verser quelques cm³ dans une boîte de Pétri ; trop alcalin, le milieu est brun-rose, trop acide, il est verdâtre ; la teinte désirée est obtenue par addition de quelques gouttes de soude 0,1 N ou d'acide chlorhydrique 0,1 N.

Répartir en gros tubes stériles, à raison de 15 cm³ environ par tube. La stérilisation des milieux ainsi préparés est inutile. Avant emploi, ce milieu, fondu, est coulé en boîte de Pétri.

3. Eau peptonée.

Peptone bactériologique exempte d'indol	15	gr.
Chlorure de sodium	5	gr.
Eau	1.000	gr.
(pH = 7,4.)		

Stériliser 20 minutes à 115°.

4. Eau peptonée lactosée additionnée d'un indicateur de pH.

Eau peptonée (formule précédente)	100	cm ³
Lactose	30	gr.

Indicateur de pH, par exemple :

Solution stérile de tournesol à 1 p. 150	50 gouttes
ou Solution de bromothymol à 1,5 ‰ dans l'alcool à 60° ..	30 gouttes

Stériliser 20 minutes à 115°.

5. Gélose au rouge neutre.

Bouillon nutritif (formule précédente)	1.000 cm ³
Gélose	5 gr.

Stériliser 20 minutes à 120°. Filtrer. Ajouter :

Glucose	2 gr.
---------------	-------

Solution de rouge neutre à 1 % : Q. S. pour obtention d'une teinte rouge-cerise.

Répartir en tubes à essais (culot) à raison de 5 cm³ par tube environ.

Stériliser 20 minutes à 115°.

6. Gélose au sous-acétate de plomb.

Bouillon nutritif (formule précédente)	1.000 cm ³
Gélose	20 gr.

Stériliser 20 minutes à 120°. Filtrer.

Répartir en tubes à raison de 5 cm³ par tube environ.

Stériliser 20 minutes à 115°. Ajouter aseptiquement, dans chaque tube de gélose fondue et ramenée à 60° environ : 0 cm³ l d'une suspension à 1 p. 10 de sous-acétate de plomb en eau distillée stérile.

Agiter fortement et refroidir rapidement.

(A suivre.)

ISOLEMENT DE FERMENTS LACTIQUES PARTICULIERS AU LAIT DE BREBIS ET AU FROMAGE DE ROQUEFORT

par

CHARLES ALAIS

Ingénieur chimiste E.C.I.L.

Nous avons isolé du fromage de Roquefort et du lait de brebis, qui est employé à sa fabrication, des souches de bactéries lactiques, qui ont montré d'étonnantes et profondes différences d'activité, selon qu'on les utilisait dans le lait de brebis ou dans le lait de vache, comme levain lactique.

Le but premier de notre travail était de rechercher sur les meilleurs produits de la fabrication de Roquefort des ferments lactiques vigoureux que nous voulions substituer aux ferments d'origines diverses utilisés jusque-là dans cette fabrication. Ces ferments, originaires de laits de vaches, donnaient des résultats irréguliers dans