

après incubation d'un lait renfermant moins de 10 germes de *B. Coli* au litre, sont donc largement remplies, même pour un lait atteignant 70° D. au cours de cette incubation de 8 heures, c'est-à-dire même dans les cas pratiques les moins favorables.

C. CONCLUSION DES ESSAIS RELATIFS A L'INFLUENCE DE L'ACIDE LACTIQUE LIBRE SUR LE DÉVELOPPEMENT DU *B. COLI*.

Les essais qui précèdent, et dont les résultats ont été confirmés à plusieurs reprises, nous apprennent :

1° Que dans du lait maintenu à une acidité constante pendant l'incubation, la prolifération du *B. Coli* est arrêtée par une acidité de 60° D. correspondant à 4 gr. environ d'acide lactique, et ralentie pour des doses inférieures.

2° Que dans l'eau peptonée maintenue à une acidité constante pendant l'incubation, la prolifération du *B. Coli* est arrêtée par une acidité de 1 gr. 5 d'acide lactique par litre et ralentie pour des doses inférieures.

3° Que dans des laits stériles où on réalise artificiellement pendant 8 heures, par des apports d'acide lactique, la marche de l'acidification spontanée des laits du commerce, la prolifération du *B. Coli* est à peine gênée quand il s'agit d'acidification lente et n'est gênée qu'en fin d'incubation pour une acidification rapide.

4° Que dans tous ces cas d'acidification artificielle, la prolifération du *B. Coli* en 8 heures à 37° est suffisante pour permettre des repiquages positifs de 1 cm³ en fin d'incubation, même dans le cas d'acidifications rapides correspondant à des laits fortement chargés en ferments lactiques.

L'influence de l'acidification lactique du lait sur la croissance du *B. Coli*, en l'absence d'autres germes, étant maintenant suffisamment connue, il importe de se demander quelle peut être l'influence des corps microbiens des ferments lactiques en l'absence d'acidité libre.

(A suivre.)

L'ÉPREUVE DE LA RÉDUCTASE APPLIQUÉE A LA CASÉINE A LA PRÉSURE

par

ANDRÉ CHOLLET

et

ANDRÉ CAMUS

Ingénieur agronome

Ingénieur agricole

Directeur de l'Ecole professionnelle
de Laiterie de Surgères

Chef de travaux à l'Institut
des Recherches agronomiques

(Travail effectué à la Station de Recherches laitières de Surgères.)

Pendant très longtemps la plupart des fabricants de matières

plastiques classaient la caséine à la présure d'après la coloration qu'elle présentait après un passage à l'étuve à 100° pendant 5 heures, la caséine de première qualité restant blanche pendant cette épreuve. La coloration est due à la présence d'un excès de matière grasse provenant parfois d'un écrémage défectueux ou à une température trop élevée pendant le séchage. Mais elle provient généralement du lactose, resté dans la caséine, par suite de l'insuffisance des lavages.

Depuis le début de l'année 1930, une des plus importantes fabriques de matières plastiques a demandé qu'on lui livre des caséines résistant à l'épreuve microbienne de la réductase. Elle a été gênée, en effet, à l'un des stades de sa fabrication, par certains microbes qui provoquent des fermentations dans la masse plastique. C'est ce qui a incité le laboratoire de cette usine à rechercher les caséines contaminées par l'épreuve suivante : 15 gr. de la caséine à essayer sont broyés à l'état de gruaux moyens et mélangés avec 5 cm³ d'une solution de bleu de méthylène au 1/10.000 jusqu'à ce que la masse prenne une coloration homogène. Ils sont introduits dans un tube à essais bouché par un capuchon en caoutchouc, et placés à l'étuve à 50° pendant 18 heures. Les caséines qui ne présentent pas de taches après ce laps de temps sont reconnues bonnes ; celles qui n'en présentent que quelques-unes sont acceptables, mais celles qui en présentent beaucoup ne peuvent pas servir à la fabrication de certaines matières plastiques. Ces taches proviennent de la décoloration du bleu de méthylène par les colonies microbiennes. Elles peuvent être soit blanchâtres, avec liquéfaction de la caséine, soit brunâtres et liquéfiantes, soit blanches, d'aspect crayeux et sans liquéfaction.

Nous avons un peu modifié cette technique, estimant que les causes de contamination étaient trop grandes au cours des manipulations. Nous opérons dans des tubes flambés, bouchés par un tampon de coton. La préparation du bleu de méthylène se fait dans des flacons stériles. Le bleu est versé au moyen d'une burette également stérile. Quant au mélange, qui se fait forcément à l'air libre, autant que possible à l'abri des contaminations, nous le faisons dans un mortier stérilisé par l'eau de Javel et débarrassé de l'excès d'eau de Javel par lavage à l'eau stérile. Grâce à ces modifications, adoptées récemment par le laboratoire de l'usine, nous avons pu obtenir des résultats et des classements comparables.

Une partie des caséines de l'Union des Caséineries des Charentes et du Poitou ne résistaient pas à cette épreuve. C'était la perte, partielle tout au moins, d'un des gros débouchés de la caséine à la présure.

Nous avons entrepris des recherches, en liaison avec le Labo-

ratoire national des Industries laitières et des Industries de fermentation, dirigé par M. GUITTONNEAU, en vue de déterminer la nature des microbes se trouvant dans les caséines qui résistaient mal à l'épreuve de la réductase, afin d'être mieux armés pour essayer d'apporter des remèdes à la fabrication. Jusqu'ici, nous avons isolé 2 espèces microbiennes.

L'une se présente dans les tubes de caséine colorée par le bleu de méthylène, sous forme de petites boules blanches crayeuses, qui ne semblent pas altérer la caséine. On les trouve parfois dès la sortie de l'étuve à 50°. Mais elles se développent davantage, par la suite, si l'on garde le tube à la température du laboratoire, ce qui semble indiquer que les microbes qui les provoquent ne sont pas à 50° à leur température optima. Nous en avons cependant poursuivi l'isolement.

L'autre espèce donne dans les tubes des taches blanches s'étalant rapidement si on les laisse à 50° et qui liquéfient la caséine.

MILIEU DE CULTURE. — Nous nous sommes adressés à du sérum de lait gélifié à 1,5 %. Pour apporter un aliment azoté ressemblant à la caséine sans nuire à la limpidité du milieu, nous avons été amenés à y ajouter 1 % de caséine aux acides, dite caséine pharmaceutique.

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION. — Pour isoler la première espèce, nous avons prélevé au fil de platine une de ces concrétions crayeuses. Après l'avoir écrasée dans un petit mortier stérile avec quelques centimètres cubes d'eau stérile, nous avonsensemencé des boîtes de PÉTRI avec cette eau. Ces boîtes ont été mises à différentes températures : 50°, 40°, 30-35°. Le lendemain les premières colonies sont apparues dans les boîtes placées à 30-35°. Elles ont été reprises et repiquées en tubes inclinés. Nous avons ainsi obtenu des cultures pures d'un microbe se présentant au microscope sous forme de longs filaments pouvant se diviser en arthrospores. L'aspect des cultures et leur odeur de terre caractéristique sont suffisants pour classer cette espèce dans le groupe des Actinomycètes. Les différents milieux sur lesquels nous l'avons cultivée ont confirmé cette opinion.

La deuxième espèce a été isolée de la même façon. Une tache a été touchée au fil de platine et diluée dans de l'eau stérile ; cette dilution a servi à ensemencer le milieu de cultures en boîte de PÉTRI. A 50° les colonies se développent très rapidement. Repiquées, elles nous ont donné des cultures pures sous forme d'un voile plissé. Le microscope et les caractères cultureux nous ont permis de voir que nous avions affaire à un bacille du genre *Bacillus mesentericus*.

Nous nous sommes assurés que ces espèces reproduisaient bien les taches sur lesquelles elles avaient été prélevées en les ensemencant

dans de la caséine stérile. Nous nous sommes heurtés là à une petite difficulté : la caséine, se présentant sous forme de grumeaux, ne se stérilise pas facilement. Si on la chauffe à une trop forte température, elle jaunit, et l'épreuve de la réductase est rendue difficile, certains points jaunes pouvant être pris pour des taches microbiennes. Nous y sommes arrivés en chauffant cette caséine à 115° à plusieurs reprises à l'autoclave. Les témoins n'ont pas présenté de taches.

Nous avons donc affaire à 2 espèces tout à fait banales, rencontrées dans tous les milieux naturels : air, eau, sol ; espèces très résistantes à la chaleur par leurs spores, ce qui explique qu'elles ne sont pas tuées par le séchage de la caséine. Il en existe vraisemblablement plusieurs autres, que nous nous efforcerons d'isoler.

Remèdes. — Au cours de ces recherches, nous avons remarqué que les caséines fabriquées en été avec des laits légèrement acides résistaient beaucoup mieux à l'épreuve de la réductase que les caséines fabriquées en hiver. Nous avons donc fait l'hypothèse d'une relation entre l'acidité du lait et l'absence des ferments décolorant le bleu de méthylène. D'ailleurs, le bacille de la pomme de terre ne vit pas facilement en milieu acide, et l'acidité des laits s'oppose à son développement ; nous avons, en effet, vérifié expérimentalement qu'il ne se développait pas dans du sérum de caséinerie ou dans du lait écrémé quand l'acidité dépassait 2 gr. 5 d'acide lactique par litre.

Il suffirait de n'emprésurer que des laits écrémés légèrement acides pour avoir des caséines supportant l'épreuve de la réductase.

Malheureusement cette façon de procéder présente un inconvénient, car les caséines à la présure, fabriquées avec des laits légèrement acides, ont leur composition chimique modifiée, sont moins riches en cendres, et par suite sont commercialement moins cotées.

Nous avons alors cherché à voir quelle était l'influence de l'acide lactique, ajouté à la caséine sèche, au moment où on la soumet à l'épreuve de la réductase.

Avec une caséine de mauvaise qualité, nous avons fait les expériences suivantes :

1° Epreuve de la réductase, telle qu'elle est faite ordinairement.

2° Epreuve de la réductase en acidifiant le bleu de méthylène par l'acide lactique de telle sorte qu'il y ait 1 gr. d'acide lactique par 1.000 gr. de caséine (soit 3 % d'acide lactique dans le bleu de méthylène).

3° Epreuve de la réductase avec une solution de bleu de méthylène acidifiée par l'acide lactique de telle sorte qu'il y ait 5 gr. d'acide lactique par 1.000 gr. de caséine.

4^o Epreuve de la réductase avec une solution de bleu de méthylène acidifiée par l'acide lactique de telle sorte qu'il y ait 10 gr. d'acide lactique par 1.000 gr. de caséine.

La caséine acidifiée à 1 ‰ s'est montrée encore mauvaise, mais elle présentait beaucoup moins de colonies que l'essai-témoin ; par contre les caséines acidifiées à 5 et 10 ‰ ne présentaient aucune tache.

Si l'emploi de l'acide lactique n'a pas d'inconvénient pour les matières plastiques, il serait donc possible aux fabricants d'éviter les fermentations qui les gênent en mouillant leurs caséines, non avec de l'eau pure, mais avec de l'eau acidulée, de telle sorte que celle-ci introduise dans la masse une quantité d'acide lactique qu'ils détermineraient facilement avec précision, mais qui, d'après nos expériences, doit être comprise entre 1 et 5 ‰.

UNE AMÉLIORATION IMPORTANTE DU BOUCHON ANAÉROBIE AU PYROGALLOL.

par W. DORNER et W. RITTER

de l'Etablissement fédéral d'industrie laitière et de bactériologie,
Liebefeld-Berne.

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

L'emploi de mélanges de pyrogallol et d'alcalis pour absorber l'oxygène dans des cultures de bactéries a été décrit en premier lieu par BUCHNER [1]. Selon une communication particulière du Prof. ORLA-JENSEN, STRIBOLT [2], au Danemark, puis WRIGHT [3], aux Etats-Unis, ont développé un procédé s'appliquant individuellement aux tubes de culture. BURRI [4] a ensuite amélioré ce procédé en mettant les réactifs pour l'absorption de l'oxygène sur un bouchon d'ouate hydrophile introduit spécialement dans ce but. On a remarqué depuis, sans savoir pourquoi, qu'un grand nombre d'espèces de microbes anaérobies se développaient mal ou ne venaient pas du tout en cultures superficielles sous ce bouchon.

C'est un travail de ROCKWELL et HIGHBERGER [5] qui a donné la clef du mystère. Ces auteurs ont en effet prouvé que les microbes ont besoin d'acide carbonique pour vivre. Or, les bouchons anaérobies mentionnés n'absorbent pas seulement l'oxygène ; ils absorbent aussi l'acide carbonique, par suite de l'excès d'alcali employé.

Des essais que nous avons entrepris ont confirmé entièrement les résultats de ROCKWELL et HIGHBERGER. Comme eux, nous avons pu empêcher complètement le développement de certaines espèces microbiennes en les cultivant sur les milieux usuels dans un réci-