



**HAL**  
open science

**MISE EN ÉVIDENCE DES STREPTOCOQUES LACTIQUES  
INHIBITEURS ET STIMULANTS DANS LE LAIT ET LES  
FROMAGES. FRÉQUENCE DE CES STREPTOCOQUES DANS  
LE LAIT CRU ET LES FROMAGES FERMIERS PRODUITS  
DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DE FRANCE**

R. Chevalier, Jeanne Fournaud, Elisabeth Lefebvre, G. Mocquot

► **To cite this version:**

R. Chevalier, Jeanne Fournaud, Elisabeth Lefebvre, G. Mocquot. MISE EN ÉVIDENCE DES STREPTOCOQUES LACTIQUES INHIBITEURS ET STIMULANTS DANS LE LAIT ET LES FROMAGES. FRÉQUENCE DE CES STREPTOCOQUES DANS LE LAIT CRU ET LES FROMAGES FERMIERS PRODUITS DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DE FRANCE. *Le Lait*, 1958, 38 (375\_376), pp.255-276. <hal-00928216>

**HAL Id: hal-00928216**

**<https://hal.science/hal-00928216v1>**

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire HAL, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

bouteilles, cette dernière technique constituant une synthèse des deux précédentes et conduisant à des résultats excellents : assez longue durée de conservation, absence d'altérations organoleptiques.

## MISE EN ÉVIDENCE DES STREPTOCOQUES LACTIQUES INHIBITEURS ET STIMULANTS DANS LE LAIT ET LES FROMAGES (1)

### FRÉQUENCE DE CES STREPTOCOQUES DANS LE LAIT CRU ET LES FROMAGES FERMIS PRODUITS DANS DIFFÉRENTES RÉGIONS DE FRANCE

par

R. CHEVALIER (2), JEANNE FOURNAUD,  
ELISABETH LEFEBVRE et G. MOCQUOT

*Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières  
Jouy-en-Josas*

#### I. — INTRODUCTION

L'équilibre qui s'établit entre les espèces microbiennes qui constituent la flore du lait fait depuis de longues années l'objet de nombreux travaux d'intérêt théorique et pratique.

En 1928, ROGERS [1] a signalé que des streptocoques lactiques peuvent inhiber le développement d'autres streptocoques lactiques et de *Lactobacillus bulgaricus*. En 1933, WHITEHEAD [2] en Nouvelle-Zélande a trouvé, dans des échantillons de lait de vache, des streptocoques inhibiteurs pour d'autres bactéries lactiques. A partir de certains laits de mélange, WHITEHEAD et RIDDET [3] ont isolé un organisme susceptible de provoquer une inhibition de l'acidification au cours de la fabrication du fromage. MEANWELL [4], en Angleterre, a fait des observations identiques. COX et WHITEHEAD [5] examinant des échantillons prélevés journellement pendant toute l'année sur le lait de mélange d'un troupeau d'une centaine de vaches, ont trouvé des organismes inhibiteurs dans 17,8% des échantillons.

HOYLE et NICHOLS [6] ont étudié les streptocoques lactiques entrant dans la constitution des levains. Parmi 276 souches examinées, ces auteurs en ont trouvé 78 qui produisaient une subs-

(1) *Ann. Tech. Ag. (I. N. R. A.)*, 1957, n° 2, p. 117.

(2) Adresse actuelle : Maître de Conférence à l'Institut National Agronomique, 9, rue de l'Arbalète, Paris-Ve.

tance inhibant le développement d'autres streptocoques lactiques. Sur 220 souches de *Streptococcus cremoris* provenant de 13 levains commerciaux, 59 (27%) étaient inhibitrices et parmi 56 souches isolées de 8 échantillons de lait acide et classées comme *Streptococcus lactis*, 19 (34%) étaient également inhibitrices. Les auteurs font remarquer que certaines des souches inhibitrices ainsi isolées pouvaient être identiques car plusieurs d'entre elles provenaient d'un même échantillon de levain commercial ou de lait en voie d'acidification.

HIRSCH et WHEATER [7] ont fait porter leurs travaux sur près de 10.000 échantillons provenant de différentes sources : lait cru (1069) et pasteurisé (618), fromage (702), selles humaines, bovines et porcines, contenu de panse de bovins, enfin prélèvements du nez et de la gorge chez l'homme. Ils ont trouvé 56 cultures inhibitrices, dont 28 donnant un taux d'inhibition faible appartenaient en majorité à l'espèce *Streptococcus faecalis*.

Les 24 autres cultures classées comme *Str. lactis*, provenaient d'échantillons de lait ou de produits laitiers (12) ; de prélèvements effectués sur l'homme dans le nez et la gorge (10), de selles humaines (2).

BARIDO et FOSTER [8] ont étudié neuf souches de *Str. lactis*, une souche de *Str. cremoris* et trois cultures provenant de levains commerciaux. Ils ont trouvé qu'elles produisaient une substance thermostable qui inhibe la croissance de *Lactobacillus casei*, ainsi que celles d'autres streptocoques lactiques, ces derniers étant cependant moins inhibés que le lactobacille.

On doit signaler enfin les travaux de KOOY et PETTE [9] en Hollande qui ont également examiné des échantillons provenant de différentes sources. Ils ont trouvé des streptocoques inhibiteurs dans les proportions suivantes :

- 1 souche inhibitrice sur 95 souches isolées de 50 fromages ;
- 3 souches inhibitrices sur 165 cultures provenant de 51 échantillons de lait cru ;
- 7 souches inhibitrices sur 30 souches de streptocoques acidifiant le lait, isolées à partir de 28 fèces.

Après avoir montré avec HIRSCH [10] que la nisine produite par certaines souches de *Str. lactis* inhibe le développement de beaucoup d'autres microorganismes que les bactéries lactiques, en particulier les Clostridia, MATTICK [11] a pensé que cette substance inhibitrice pourrait trouver des applications pratiques dans la fabrication des fromages en permettant de lutter contre les accidents de gonflement dus aux anaérobies. Des travaux dans cette

direction ont été déjà réalisés en Angleterre (12), en France (13), en Hollande (14).

Les recherches que nous poursuivons sur les applications possibles de ces bactéries inhibitrices en fromagerie nous ont conduit à constituer une collection de souches productrices de nisine. Dans le présent article, nous décrivons la méthode simple qui a été mise au point pour faciliter l'isolement de ces souches et nous donnons les résultats observés en appliquant la méthode à l'étude d'échantillons de lait cru et de fromages provenant de différentes régions de France.

## II. — PREMIÈRES MÉTHODES UTILISÉES POUR DÉCELER ET ISOLER LES STREPTOCOQUES LACTIQUES PRODUCTEURS DE SUBSTANCES INHIBITRICES

Pour rechercher les streptocoques inhibiteurs dans des échantillons de lait, COX et WHITEHEAD [5] ont utilisé la méthode connue sous le nom « d'épreuve de vitalité » (« vitality test ») ainsi que l'épreuve au bleu de méthylène mise au point par COX [15]. Cette dernière épreuve, qui est d'un emploi facile, permet d'examiner en même temps un grand nombre d'échantillons. Pour mettre en évidence les quelques germes inhibiteurs présents dans des échantillons de lait fraîchement récolté, il est nécessaire de procéder d'abord à un enrichissement en incubant les échantillons à 30° jusqu'à coagulation afin d'obtenir une quantité de substance inhibitrice suffisante pour être décelable. Une partie de la culture coagulée est ajoutée à du lait normal et, après pasteurisation et ensemencement, l'inhibition est décelée par un retard dans l'acidification (« vitality test ») ou par un retard dans la réduction d'un colorant (épreuve du bleu de méthylène) en comparant chaque fois avec un témoin pasteurisé et ensemencé dans les mêmes conditions.

Pour déceler et isoler les streptocoques lactiques producteurs de substances inhibitrices, on peut également procéder à des isollements sur gélose à partir des échantillons de lait soumis aux examens en utilisant les techniques classiques. On repique, en les prélevant au hasard, un grand nombre de colonies. Les cultures obtenues sont ensuite inoculées — soit directement, soit après traitement convenable qui permet de détruire les cellules microbiennes sans altérer la substance inhibitrice — dans du lait ensemencé avec une autre bactérie lactique sensible et choisie comme organisme test. Les cultures qui produisent un retard dans la formation d'acide lactique par l'organisme test sont considérées comme inhibitrices.

L'emploi de techniques spécialement adaptées à la recherche

des micro-organismes producteurs d'antibiotiques a constitué un progrès important. Ces techniques permettent en effet de repérer directement les colonies inhibitrices parmi toutes les colonies isolées sur milieu gélosé en boîtes de Petri.

C'est ainsi que HIRSCH et WHEATER [7] ont utilisé pour une partie de leurs travaux une modification de la technique de KELLNER [16]. Elle consiste à employer trois couches stratifiées de milieu gélosé. Une première couche est ensemencée avec une dilution convenable de l'échantillon à examiner de façon à obtenir 50 à 100 colonies séparées. Une deuxième couche (4 ml. de milieu gélosé) est ensuite coulée sur la première et les boîtes de Petri sont incubées à 37° pendant la nuit. Une troisième couche de milieu gélosé, ensemencée avec *Streptococcus agalactiae* comme organisme test, est enfin coulée à la surface de la deuxième couche et les boîtes de Petri sont de nouveau mises à incuber à 37° pendant 24 heures. Au bout de ce temps, *Str. agalactiae* s'est développé dans la gélose et a rendu le milieu opaque. On observe alors que certaines des colonies de streptocoques lactiques qui ont poussé dans la première couche sont auréolées d'une zone claire dans laquelle *Str. agalactiae* ne s'est pas développé : on repique ces colonies sur bouillon, et on les éprouve par une méthode de dilution pour confirmer leurs propriétés inhibitrices.

L'interposition d'une couche médiane de milieu gélosé réduit, d'après les auteurs, l'effet inhibiteur de l'acide lactique et la possibilité de formation d'eau oxygénée par les colonies développées dans la première couche. Elle évite ainsi de confondre l'action inhibitrice de ces substances avec celles des antibiotiques. Elle permet en revanche de mettre en évidence l'action des antibiotiques même lorsqu'ils diffusent lentement comme la nisine.

HIRSCH, McCLINTOCK et MOCQUOT [17] ont utilisé une technique un peu différente pour rechercher les streptocoques inhibiteurs. Une dilution de l'échantillon examiné, calculée pour obtenir le développement d'une trentaine de colonies, est ensemencée par étalement à la surface d'un milieu gélosé préalablement coulé en boîte de Petri. La composition du milieu (milieu Y. G. A. des auteurs) est la suivante :

	%
Yeastrel .....	0,3
Lab Lemco .....	0,5
Peptone Evans .....	0,3
Glucose .....	1,0
Gélose .....	2,0

Le milieu est rendu sélectif pour les streptocoques en ajoutant 0,05% d'acétate de thallium.

Les boîtes de Petri sont d'abord incubées à 30° pour permettre le développement des streptocoques lactiques. On coule ensuite dans les boîtes une deuxième couche constituée par de la gélose nutritive (N. A.)ensemencée à la dose de 1% avec une dilution au 1/100<sup>e</sup> d'une culture de 48 heures à 37°, sur bouillon nutritif, de *Staphylococcus aureus* utilisé comme organisme test. Avant l'ensemencement du staphylocoque, on ajoute au milieu une quantité convenable d'une solution de phosphate à 50% stérilisée par filtration, de manière à obtenir une concentration en phosphate de 1% dans le milieu. Le phosphate en tamponnant le milieu, évite la formation de zones d'inhibition dues à la production d'acide lactique par les colonies de streptocoques.

Les boîtes de Petri sont alors conservées à la glacière pendant 24 heures pour permettre aux substances antibiotiques produites dans la première couche de milieu de diffuser vers la deuxième couche qui contient l'organisme test. Puis les boîtes sont soumises à une incubation de 24 heures à 37° qui favorise le développement du staphylocoque sauf dans la zone qui entoure les colonies productrices de substances antibiotiques.

Cette technique est l'une de celles que nous avons d'abord utilisées en lui apportant les légères modifications suivantes :

a) Les deux couches stratifiées sont préparées avec le même milieu (milieu Y. G. A.).

b) L'organisme test est le *Str. cremoris* (1P5) inoculé à la dose de 1% d'une dilution à 10%, préparée elle-même à partir d'une culture sur lait de 24 heures à 22°. En effet, il nous a paru plus indiqué d'employer un streptocoque lactique comme organisme test pour des travaux orientés vers des applications en laiterie. De plus la souche 1P5 est celle que nous utilisons pour vérifier par culture en milieu liquide (sur lait tournesolé) la production des substances inhibitrices et pour doser ces dernières.

La méthode peut donner de bons résultats mais présente cependant quelques inconvénients : tout d'abord elle se révèle assez longue dans l'application pratique lorsqu'on veut étudier un grand nombre d'échantillons ; ensuite on observe fréquemment qu'un certain nombre de germes provenant de colonies développées sur la première couche sont entraînés dans la seconde au moment où celle-ci est coulée sur la première. Ces germes donnent naissance à de nouvelles colonies qui rendent les observations, dénombrements et repiquages difficiles.

### III. — NOUVELLE MÉTHODE PROPOSÉE

#### 1. — Principe

On met à profit la différence qui sépare les zones de températures favorables au développement de deux types de germes : d'une part les streptocoques lactiques que l'on veut étudier et d'autre part une souche de lactobacille utilisée comme organisme test.

La méthode consiste à ensemercer, en milieu gélosé, une dilution convenable de l'échantillon à examiner de façon à obtenir des colonies séparées de streptocoques lactiques et à inoculer en même temps, dans le même milieu, une suspension d'un lactobacille thermophile.

On incube d'abord les boîtes à température relativement basse (20° environ) : seuls les streptocoques poussent. S'ils produisent des substances inhibitrices ou stimulantes, celles-ci ont le temps de diffuser dans la gélose même lorsqu'il s'agit de grosses molécules, comme c'est le cas pour la nisine.

On porte ensuite les boîtes à plus haute température et le lactobacille se développe en « révélant » par des zones de croissance plus fortes, ou au contraire plus faibles ou nulles, autour de certaines colonies de streptocoques, la présence de substances stimulantes ou inhibitrices.

#### 2. — Choix d'une souche de lactobacille comme organisme test

Pour choisir une souche de lactobacille pouvant convenir comme organisme test nous nous sommes basés sur deux épreuves : 1) sensibilité à la nisine ; 2) non développement à une température égale ou inférieure à 30°.

Dans un essai préliminaire, nous avons examiné 12 souches de lactobacilles : 2 provenant de la collection de la Station de Recherches laitières de Poligny (Jura) et 10 isolées des produits suivants : yoghourt, 3 ; macération de caillettes, 6 ; salive humaine, 1.

La sensibilité à la nisine a été mesurée en utilisant comme source de nisine le sérum d'une culture sur lait de *Str. lactis*, souche F4 de notre collection. On a comparé les résultats des dosages effectués sur ce sérum par la méthode des dilutions en utilisant tour à tour chaque souche de lactobacille comme organisme test.

Pour mesurer la vitesse de développement des lactobacilles à 30°, nous avons suivi le pH d'une culture de chaque lactobacille ensemercé sur lait stérilisé par passage à l'autoclave.

Nous avons finalement retenu une souche LY3, isolée d'un yoghourt, qui a été identifié selon BRIGGS [18] comme appartenant à l'espèce *Lactobacillus lactis*. Elle se développe relativement vite à 30° et s'est révélée comme la plus sensible à la nisine : sa croissance est inhibée pendant 15 heures à 37° par une dilution à 1/640 du sérum de la culture de streptocoque inhibiteur ce qui correspond, en comparant avec une solution de nisine pure, à 0,6 unités Reading de nisine/ml. Cette souche LY3 a été retenue pour tous les essais réalisés au cours de ce travail.

### 3. — Choix du milieu de culture

Nous avons utilisé le milieu additionné de jus de tomate et glucose que BRIGGS [18] a mis au point pour la culture des lactobacilles. Sous forme de bouillon ce milieu nous a servi pour l'entretien de la souche test LY3 : une culture de 15 heures à 37° de cet organisme a toujours été utilisée pour les essais que nous décrivons dans ce travail.

Nous nous sommes assurés que ce même milieu gélosé convient également bien pour la culture des streptocoques lactiques et que le développement de ces derniers n'est pas gêné par celui du lactobacille. Ceci ressort du résultat des dénombrements que nous avons effectués : ils ont porté d'une part sur la souche F4 de streptocoque inhibiteur, d'autre part sur un échantillon de lait cru (P8). Deuxensemencements ont été faits en parallèle, en présence et en l'absence de l'organisme test. Ce dernier a été utilisé à la dose de 1% (essai portant sur la souche F4) ou 0,1% (essai de l'échantillon de lait cru P8). Dans les deux cas, les boîtes de Petri ont été incubées pendant 24 heures à 30°, puis 24 heures à 37° avant d'effectuer la numération des colonies de streptocoques. Les chiffres du tableau I montrent que le nombre de colonies de streptocoques développées est pratiquement le même en présence ou en l'absence des lactobacilles.

TABLEAU I

DÉVELOPPEMENT DES COLONIES DE STREPCOTOQUES LACTIQUES  
SUR LE MILIEU GÉLOSÉ DE BRIGGS, ENSEMENCÉ OU NON,  
AVEC « LACTOBACILLUS LACTIS LY3 »

	Nombre de colonies de streptocoques	
Souche inhibitrice (F4) ..	{ sans LY3 . . . . .	87 × 10 <sup>7</sup>
	{ avec LY3 (1%) . . . . .	80 × 10 <sup>7</sup>
Echantillon de lait cru (P8)	{ sans LY3 . . . . .	40 × 10 <sup>2</sup>
	{ avec LY3 (0,1%) . . . . .	38 × 10 <sup>2</sup>

Le fait d'ensemencer en même temps et dans la masse du milieu gélosé, les streptocoques et le lactobacille, nous avait conduit à penser qu'il serait peut-être nécessaire de tamponner le milieu avec 1% de phosphate, comme le faisaient HIRSCH, McCLINTOCK et MOCQUOT [17] pour éviter les interférences dues à la production d'acide lactique par les streptocoques.

L'essai suivant nous a montré qu'il n'est pas indiqué de tamponner le milieu. Deux séries de boîtes de Petri ont été ensemencées avec le streptocoque inhibiteur F4 et 1% de la souche test LY3 : une des séries seulement recevait du phosphate. Les boîtes ont été ensuite incubées 24 heures à 30° puis 24 heures à 37°, avec ou sans séjour de 24 heures à la glacière entre les deux incubations.

Nous avons observé la formation de zones d'inhibition peu nettes en présence de phosphate par suite d'un mauvais développement du lactobacille, tandis qu'on obtenait de très belles zones d'inhibition en l'absence de phosphate.

D'autre part, nous avons pu vérifier que des streptocoques produisant des doses d'acide lactique égales à celles des streptocoques inhibiteurs — c'est le cas par exemple de *Str. cremoris* 1P5 — ne donnaient pas de zones d'inhibition lorsqu'on les cultive sur un milieu sans phosphate.

#### 4. — Recherche des conditions optima de températures et durées d'incubation pour la formation des zones d'incubation

Nous avons ensemencé une série de boîtes de Petri avec une même dose de la souche inhibitrice F4, calculée pour obtenir des colonies bien isolées, et une même dose (1%) de l'organisme test LY3. Le contenu (20 ml.) d'un tube de milieu de BRIGGS gélosé et stérile a été coulé aussitôt après dans chaque boîte. Celles-ci ont été placées successivement et pendant une durée variable à différentes températures. Les combinaisons température-temps qui ont été étudiées sont les suivantes :

a) *Incubation initiale*, température : 15°, 22° ou 30° ; durée 24, 48 ou 72 heures. A 30° nous avons également étudié des durées d'incubation de 14, 17 et 20 heures.

b) *Incubation finale*, température : 30° et 37° ; durée 24 ou 48 heures. Dans quelques cas, l'incubation finale commencée à 30° a été terminée à 37°.

c) L'incubation initiale et l'incubation finale ont été séparées ou non par un séjour de 24 heures à la glacière (+ 5°).

d) Enfin, pour 4 combinaisons, nous n'avons fait qu'une incubation limitée à 24 ou 48 heures soit à 22°, soit à 30°.

Au total, 75 combinaisons différentes comportant des séjours successifs à 15°, 22°, 30° ou 37°, avec ou sans passage intermédiaire à la glacière ont été ainsi étudiées.

### Résultats

Avec 19 combinaisons nous n'avons pas obtenu de zones d'inhibition par suite du mauvais développement de l'organisme test. Ceci s'observe quand on procède à une seule incubation limitée à 24 heures à la température de 22° ou 30°, ou quand la durée d'incubation finale à 30° n'est que de 24 heures.

D'autre part, le développement du lactobacille au cours d'une incubation finale à 30° est toujours fortement retardé quand l'incubation initiale, réalisée à une température inférieure à 30° a été longue.

Parmi les 56 combinaisons avec lesquelles nous avons observé des zones d'inhibition, le diamètre de ces zones variait, suivant la combinaison adoptée, de 8 à 40 mm.

A titre d'exemple, nous avons observé des zones d'inhibition de :

— 8 mm. pour la combinaison comportant une incubation initiale de 14 heures à 30°, suivie d'un séjour de 24 heures à la glacière et d'une incubation finale de 24 heures à 37°.

— 40 mm. pour la combinaison comportant : une incubation initiale de 48 heures à 22° puis de 24 heures à 30°, un séjour de 24 heures à la glacière, puis une incubation finale de 24 heures à 37°.

Un allongement de l'incubation initiale à 22° et un séjour intermédiaire à la glacière pendant 24 heures permettent l'un et l'autre d'augmenter le diamètre des zones d'inhibition, mais les colonies du lactobacille sont plus clairsemées et la bordure des zones d'inhibition est par conséquent moins nette qu'avec une durée d'incubation initiale plus courte.

D'autre part, il n'est pas intéressant, pratiquement, d'obtenir des zones d'inhibition de trop grand diamètre car la présence d'un nombre, même faible, de colonies inhibitrices sur une boîte de Petri suffit alors à empêcher l'observation des zones : la croissance du lactobacille est en effet complètement inhibée ou limitée seulement à quelques plages peu étendues. Même si ce phénomène est moins marqué, les zones d'inhibition peuvent encore chevaucher l'une sur l'autre, ou bien une seule zone d'inhibition peut englober plusieurs colonies parmi lesquelles il est parfois difficile de distinguer celle qui est responsable de l'inhibition. On observe donc en général que le dénombrement des colonies inhibitrices est aléatoire ou impossible lorsque le diamètre des zones d'inhibition devient trop grand.

Enfin la méthode, pour rester simple, ne doit pas être alourdie par des incubations trop longues.

Après avoir examiné tous les résultats, et tenant compte des considérations exposées ci-dessus, nous avons retenu trois combinaisons qui paraissent les plus intéressantes :

N° 1 : incubation de 24 heures à 15° puis de 48 heures à 30° : diamètre des zones : 19 mm.

N° 2 : incubation de 24 heures à 22° puis de 48 heures à 30° : diamètre des zones : 24 mm.

N° 3 : incubation de 24 heures à 22° puis de 24 heures à 37° : diamètre des zones : 14 mm.

N° 4 : incubation de 24 heures à 22°, puis de 24 heures à 30° et enfin de 24 heures à 37° : diamètre des zones : 23 mm.

##### 5. — Etude de la proportion de colonies de streptocoques susceptibles de cultiver après repiquage

Les essais décrits au paragraphe précédent avaient permis de faire, incidemment, l'observation suivante : si l'on repique en lait tournesolé les colonies de streptocoques qui se sont développées en milieu gélosé, la proportion de celles qui cultivent est faible lorsque les boîtes de Petri contenant le milieu gélosé ont subi une incubation finale à 37°.

Or, la méthode proposée perdrait une partie de son intérêt si elle permettait seulement d'observer les colonies inhibitrices sans permettre leur culture ultérieure.

Nous avons donc effectué une série d'essais dans le but d'établir l'influence de la dose d'inoculation du lactobacille sur la vitalité des colonies de streptocoques ainsi que l'influence des températures initiale et finale d'incubation. Nous avons pu déterminer de cette façon les conditions optima, dans lesquelles on peut à la fois observer les zones d'inhibition et obtenir des cultures viables à partir des colonies produisant ces zones.

Le matériel utilisé pour l'ensemencement des milieux gélosés était constitué, soit par des cultures pures de streptocoques inhibiteurs, soit par des échantillons de lait cru de diverses provenances (Jura, Charente-Maritime, Cantal, etc.). Les résultats de divers essais, portant sur 42 échantillons de lait cru, sont donnés dans le tableau II. On voit que la proportion de colonies viables est effectivement plus élevée pour les milieux incubés à 30° que pour ceux incubés à 37°.

La dose d'inoculation du lactobacille influe de plusieurs manières : en faisant varier cette dose de 5% à 0,1% nous avons

TABLEAU II

NOMBRE ET PROPORTION DES COLONIES DE STREPTOCOQUES LACTIQUES INHIBITEURS SUSCEPTIBLES DE CULTIVER APRÈS REPIQUAGE

Colonies inhibitrices classées suivant le diamètre des zones d'inhibition en mm.	Nbre de colonies inhibitrices			Pourcentages		
	Repi- quées  a	Ayant cultivé		$\frac{b}{a}$	$\frac{c}{a}$	$\frac{b}{c}$
		Total b	Produc- trices de nisine c (1)			
	<i>Inoculum LY3 : 0,5 %</i>			Incubation { initiale 22° finale 37°		
< 5	93	20	0	2,1	—	—
5 à 10	18	4	1	22,2	5,5	2,5
10 à 15	21	9	3	42,8	14,2	33,3
15 à 20	11	4	4	36,3	36,3	100
> 20	40	38	37	95	92,5	97,3
Ensemble des colonies inhibitrices .....	183	75	45	41	24,5	60
Ensemble des colonies donnant des zones d'un diamètre supérieur à 10 mm. ....	72	51	44	71	61	86
	<i>Inoculum LY3 : 1 %</i>			Incubation { initiale 22° finale 30°		
< 5	64	38	0	59,3	—	—
5 à 10	34	21	1	61,7	2,9	4,7
10 à 15	9	7	6	77,7	66,6	85,7
15 à 20	24	20	17	83,3	70,8	85
> 20	33	32	32	97	97	100
Ensemble des colonies inhibitrices .....	164	118	56	71,9	34,1	47,4
Ensemble des colonies donnant des zones d'un diamètre supérieur à 10 mm. ....	66	59	55	89	83	93

(1) On a classé dans cette colonne les streptocoques lactiques qui produisent au moins 50 Unités Reading de nisine en culture sur lait.

observé que, dans le cas d'une incubation finale à 37°, des doses comprises entre 1 et 0,1% suffisent pour obtenir des zones d'inhibition nettes. Mais le pourcentage des colonies de streptocoques donnant des cultures viables est faible, quelles que soient la dose de lactobacille ajoutée et les conditions de température et durée de l'incubation initiale.

D'autre part, l'action léthale de l'incubation à 37° est plus marquée pour les colonies donnant des zones d'inhibition de petit diamètre (moins de 10 mm.), parmi lesquelles les producteurs de nisine sont d'ailleurs peu nombreux, que pour les colonies donnant des zones d'inhibition plus grandes.

Avec une incubation finale à 30°, la proportion des colonies viables est maxima. A cette température, il faut une dose d'inoculation du lactobacille inférieure ou égale à 1% pour obtenir des zones d'inhibition nettes. Avec des doses supérieures à 1%, le diamètre des zones diminue au fur et à mesure que la dose d'inoculation augmente.

La température de 30° pour l'incubation finale paraît donc être celle à ne pas dépasser pour obtenir à la fois des zones d'inhibition nettes et des colonies de streptocoques donnant après repiquage des cultures viables.

#### 6. — Zones d'inhibition et zones de stimulation du lactobacille

Les zones d'inhibition développées autour des colonies de streptocoques peuvent, dans certaines conditions, présenter des aspects différents : tantôt la zone d'inhibition totale, qui entoure la colonie de streptocoques, est bordée d'une « couronne » correspondant à une zone de demi-inhibition dans laquelle le lactobacille s'est légèrement développé, tantôt la zone d'inhibition totale est bordée, au contraire, par une zone étroite où la croissance du lactobacille est plus forte et plus dense que dans le reste de la culture.

Nous avons vérifié que les températures et durées d'incubation initiale et finale peuvent être responsables de ces modifications d'aspect.

D'autre part, lorsqu'on ensemence des échantillons de lait ou de fromage, on observe que certaines colonies de streptocoques sont entourées, non d'une zone d'inhibition, mais d'une zone où la croissance du lactobacille est beaucoup plus abondante que celle observée dans le reste de la gélose : ces colonies « stimulantes » se voient particulièrement bien lorsque la dose d'inoculation du lactobacille est relativement faible (0,1% par exemple).

### 7. — Technique proposée pour l'isolement des streptocoques inhibiteurs

L'ensemble des données réunies au cours de ces essais préliminaires nous permettent maintenant de définir la technique proposée pour l'isolement des streptocoques inhibiteurs.

Le milieu de culture utilisé est celui de BRIGGS [18] dont nous rappelons la formule :

	%
Jus de tomate .....	10
Neopeptone (Difco) .....	1,5
Glucose .....	2,0
Chlorure de sodium .....	0,5
Tween 80 .....	0,1
Yeastrel .....	0,6
Amidon soluble .....	0,05
Eau distillée .....	q. s.

La réaction du milieu est ajustée de manière à obtenir un  $pH$  final de 7,0.

Ce milieu liquide est utilisé pour l'entretien de l'organisme test : *Lactobacillus lactis* (LY3). Le lactobacille doit être repiqué et cultivé dans des conditions bien définies pour que le nombre des cellules microbiennes inoculées dans le milieu gélosé en boîtes de Petri soit toujours le même. Nous avons adopté la formule suivante : la culture est repiquée à raison d'une goutte pour un tube de 10 ml. de bouillon de BRIGGS et elle est incubée pendant 15 heures à 37°.

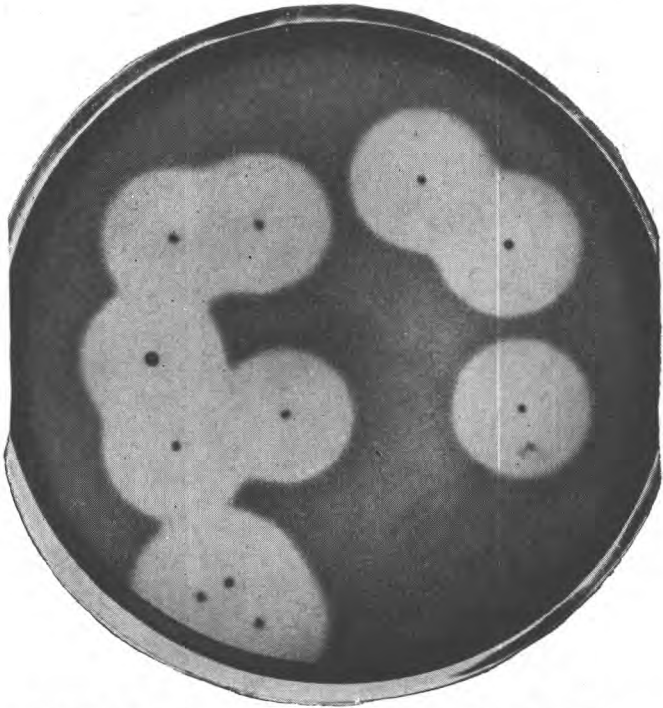
Pour rechercher, dénombrer et isoler les streptocoques inhibiteurs, le même milieu de BRIGGS est gélosé à 2% et réparti en tubes contenant chacun 20 ml. de milieu. S'il doit servir à l'examen d'échantillons de lait cru, on lui ajoute 0,05% d'acétate de thallium pour éviter le développement des sporulés et des bactéries coliformes.

Juste avant de procéder aux ensemencements le milieu est fondu au bain-marie et refroidi à 48°.

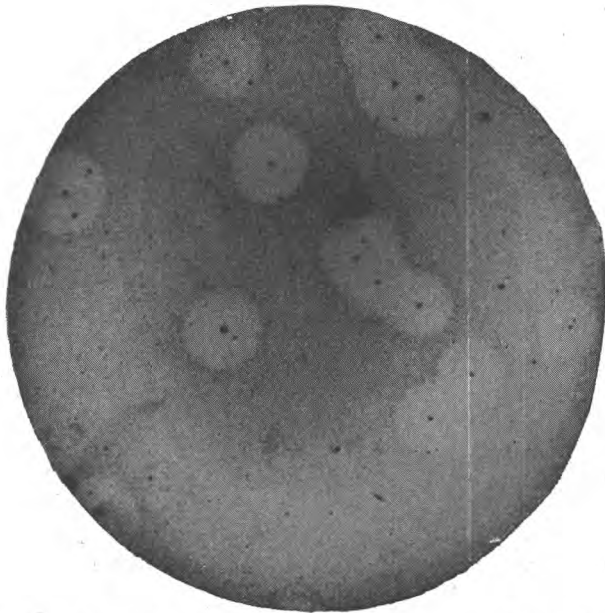
Dans une série de boîtes de Petri on place 2 ml. d'une dilution au 1/10<sup>e</sup> dans du Ringer d'une culture de l'organisme test préparée dans les conditions qui viennent d'être indiquées. L'échantillon à examiner est ensuite ensemencé par dilutions successives.

On coule enfin le milieu gélosé dans les boîtes de Petri et on mélange soigneusement.

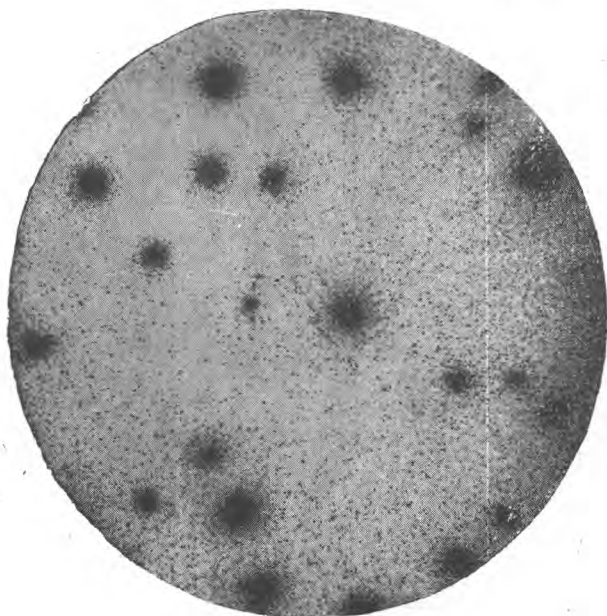
Les boîtes de Petri sont incubées pendant 24 heures à 22° puis portées pendant 40 à 48 heures à 30°. On procède alors aux observations et aux repiquages.



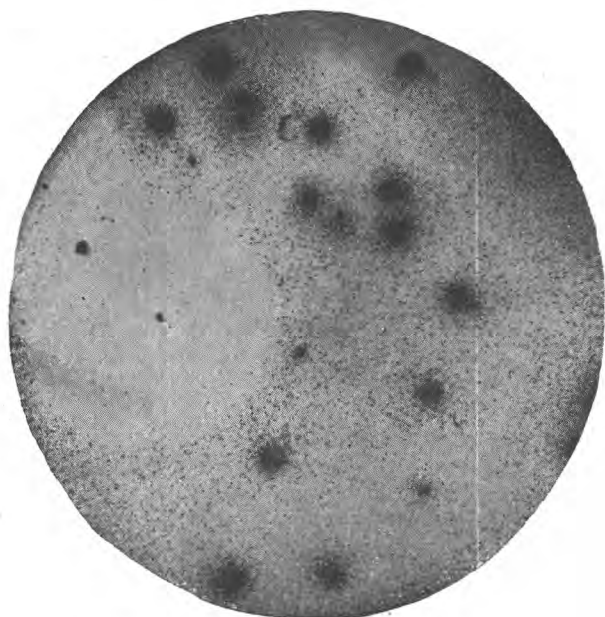
*Fig. 1.* — Zones d'inhibition données par une culture pure d'un streptocoque (*Str. lactis*) producteur de nisine



*Fig. 2.* — Lait de producteur dont la flore dominante est presque entièrement composée de streptocoques producteurs de nisine

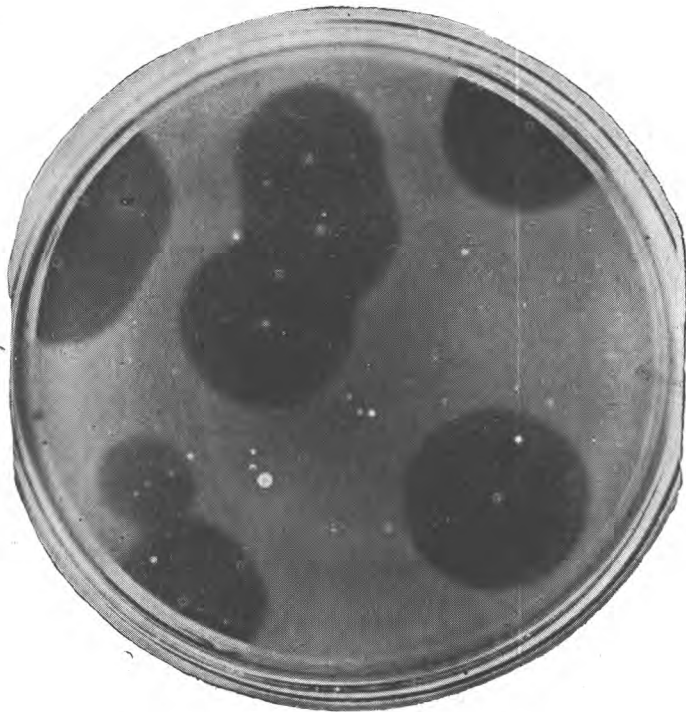


*Fig. 3.* — Lait de producteur dont la flore dominante est uniquement composée de germes stimulants



*Fig. 4.* — Lait de producteur dont la flore dominante est composée à la fois de germes stimulants et de germes producteurs de nisine

La figure 1 montre les résultats obtenus avec une culture pure d'un streptocoque producteur de nisine, les figures 2, 3, 4 et 5 montrent les résultats obtenus avec divers échantillons de lait cru et de fromage.



*Fig. 5.* — Fromage de Pont l'Évêque fermier dont la flore est composée, pour moitié environ, de streptocoques producteurs de nisine

#### Observations sur la technique proposée

On pourrait simplifier encore la technique en répartissant le milieu gélosé de BRIGGS dans des fioles, à raison de 100 ml. par fiole. Ceci permettrait, après inoculation de la gélose fondue avec l'organisme test, de couler toute une série de boîtes.

Nous préférons distribuer le milieu (20 ml.) dans des tubes pour les raisons suivantes: *a)* on évite la présence de bulles d'air gênantes dans la gélose, car le tween 80 incorporé au milieu de BRIGGS provoque la formation d'une mousse persistante au moment où l'on mélange dans les fioles la suspension de l'organisme test avec le milieu; *b)* on coule dans les boîtes des quantités uniformes de

milieu, point important lorsqu'il s'agit de procéder à des comparaisons.

En ce qui concerne maintenant le choix des températures et des durées d'incubation, d'autres combinaisons que celles indiquées plus haut peuvent assurément être utilisées, ainsi que nous l'avons indiqué à propos de notre expérience portant sur 75 combinaisons différentes.

S'il s'agit uniquement de déceler les streptocoques inhibiteurs, on peut réduire dans une grande mesure les durées d'incubation et terminer par exemple à 37°, ou encore augmenter la dose d'ensemencement de l'organisme test.

Par contre lorsqu'on veut procéder ensuite à des isolements, il paraît préférable de terminer l'incubation à 30° plutôt qu'à 37°.

Il se peut enfin que l'utilisation comme organisme test d'une souche de lactobacille différente de celle que nous avons retenue puisse nécessiter quelques adaptations de la technique pour tenir compte des exigences particulières à chaque souche.

#### IV. — APPLICATIONS DE LA MÉTHODE A L'ÉTUDE D'ÉCHANTILLONS DE LAIT CRU ET DE FROMAGES

##### 1. — Origine des échantillons

###### a) Laits

127 échantillons de lait cru (77 provenant du Jura, 50 de la Charente-Maritime) ont été examinés à l'aide de notre technique. 15 d'entre eux ont été prélevés sur des laits de mélange (lait de « chaudière » servant à la fabrication du Gruyère dans le Jura et lait de mélange prélevé dans le bac de réception des laiteries en Charente-Maritime). Les autres échantillons étaient prélevés dans les bidons de lait apportés par les producteurs.

###### b) Fromages

50 échantillons de fromages fermiers ont également été examinés : le fromage était préalablement broyé au mortier avec de l'eau stérile et les dilutions étaient faites à partir de l'émulsion ainsi obtenue.

Les fromages examinés appartenaient aux types suivants : Cantal et Laguiole (8 échantillons) ; Saint-Nectaire (3 échantillons) ; Camembert et Brie (3 échantillons) ; Pont-l'Évêque (10 échantillons) ; Fromages d'Époisses (6 échantillons) ; Livarot (11 échantillons) ; Munster et Maroilles (2 échantillons) ; Fromages de chèvre provenant de la Charente-Maritime (7 échantillons). Ces fromages prélevés à la ferme ou sur les marchés locaux, étaient

âgés de quelques jours à quelques semaines au moment de leur analyse.

Dans aucune de ces régions, les streptocoques producteurs de nisine n'ont été utilisés comme levain pour la fabrication du beurre ou du fromage et l'on peut considérer que le peuplement microbien du lait et des fromages fermiers examinés était constitué par les espèces naturellement présentes dans le milieu extérieur.

## 2. — Résultats

Le tableau III donne l'essentiel des résultats obtenus au cours de l'examen des échantillons de lait cru et de fromages. Il montre que l'on trouve des germes inhibiteurs dans la moitié environ des échantillons examinés. Cette proportion est encore plus élevée dans les échantillons de lait de mélange.

La proportion des germes inhibiteurs dans la flore totale est très variable d'un échantillon à l'autre. Alors que dans certains on ne trouve aucun germe inhibiteur, d'autres contiennent une proportion relativement faible de ces germes (0,2% ou 0,5% par exemple). D'autres enfin ont une flore constituée en majorité par des germes inhibiteurs. C'est ainsi que, dans l'un des échantillons de lait, la flore dominante était constituée par des streptocoques producteurs de nisine (1), tandis que la moitié environ de la flore lactique d'un fromage (Pont l'Évêque) était constituée par ces mêmes streptocoques (fig. 2 et 5).

Nous avons calculé la proportion moyenne des germes inhibiteurs dans la flore lactique totale de l'ensemble des échantillons examinés et nous avons trouvé qu'elle était d'environ 7% dans le cas du lait et 5% dans le cas des fromages. Si l'on calcule cette même proportion non plus pour l'ensemble des échantillons, mais seulement pour ceux qui ont présenté au moins une zone d'inhibition, les chiffres trouvés sont 16% environ pour le lait et 9% pour les fromages.

Enfin la proportion moyenne des producteurs de nisine, dans la flore lactique totale des fromages est de 2%, c'est-à-dire que 40% environ des inhibiteurs produisent de la nisine en quantité appréciable. Bien que le même chiffre, concernant les producteurs de nisine, n'ait pas pu être calculé pour l'ensemble des échantillons de lait examinés on peut voir, en reprenant les résultats du tableau II, que les colonies productrices de nisine représentent environ 47% du nombre total d'inhibiteurs isolés de 42 échantillons de lait. Ce chiffre est donc voisin de celui trouvé pour les fromages.

(1) Les germes classés dans cette catégorie sont ceux qui produisent au moins 50 Unités Reading/ml. d'une culture sur lait.

TABLEAU III

FREQUENCE ET PROPORTION DANS LA FLORE TOTALE DES STREPTOCOQUES LACTIQUES INHIBITEURS  
RENCONTRES DANS LES ECHANTILLONS DE LAIT CRU ET DE FROMAGES FERMIS

Nature des échantillons examinés	Nombre d'échan- tillons examinés	Pourcentage d'échantillons montrant la présence :		Moyenne du nombre total de germes par ml. de lait ou par g de fromage	Nombre de germes inhibiteurs % du nombre total de germes		Nombre de germes producteurs de nisine (1) % du nombre total de germes		
		de zones d'inhibition	de streptocoques producteurs de nisine (1)		dans tous les échantillons examinés	dans tous les échantillons montrant des zones d'inhibition	dans tous les échantillons examinés	dans tous les échantillons montrant des zones d'in- hibition	
<i>Laits</i>									
De producteurs.	112	41	17	10 <sup>5</sup> — 10 <sup>6</sup> val. extrêmes 10 <sup>2</sup> — 10 <sup>9</sup>	6,8	16,8			
De mélange ...	15	87	73		10,6	12,2			
Total .....	127	46	25		7,3	15,8			
<i>Fromages</i>									
De lait de vache	43	63	25	10 <sup>7</sup> — 10 <sup>8</sup>	5,5	8,8	2,5	3,9	
De lait de chèvre	7	28	0	10 <sup>7</sup> — 10 <sup>8</sup>	2,6	9,3	0,0	0,0	
Total .....	50	58	22	10 <sup>7</sup> — 10 <sup>8</sup>	5,1	8,9	2,1	3,4	
					val. extrêmes 0,0 — 50,0		val. extrêmes 0,0 — 50,0		

(1) Les souches isolées des échantillons dont le pourcentage est indiqué dans cette colonne donnent au moins 50 U.R./ml. de nisine en culture sur lait.

Les chiffres obtenus au cours de cette étude sont supérieurs à ceux indiqués par KOOY et PETTE [9] en Hollande, mais inférieurs à ceux donnés par HOYLE et NICHOLS [6] en Angleterre. Ils sont assez proches de ceux signalés par COX et WHITEHEAD [5] en Nouvelle-Zélande.

Ils montrent que les streptocoques inhibiteurs, en particulier ceux qui produisent de la nisine, constituent une fraction appréciable de la flore microbienne des laits produits en France ; il est probable que ces streptocoques inhibiteurs exercent une sélection parmi les souches sensibles à la nisine de la flore du lait.

Enfin une proportion notable d'échantillons montre la présence en mélange ou non avec les streptocoques producteurs de nisine, de colonies inhibitrices non productrices de nisine et de colonies « stimulantes » qui conservent en culture pure leur caractère inhibiteur ou stimulant quand on les ré-isole sur milieu gélosé après une série de repiquages sur lait. L'étude biochimique et écologique de ces germes est en cours.

#### RÉSUMÉ

Une méthode destinée à la numération et à l'isolement des streptocoques inhibiteurs (ou stimulants) présents dans le lait et les produits laitiers (fromages) est décrite dans ce travail. Elle consiste à ensemercer en même temps dans un milieu nutritif gélosé réparti en boîtes de Petri une dilution convenable de l'échantillon à examiner et une suspension de l'organisme test. Ce dernier est un lactobacille (*L. lactis*) se développant seulement à une température égale ou supérieure à 30°.

Les boîtes de Pétri sont incubées d'abord pendant un certain temps (24 heures par exemple) à température relativement basse (15 ou 22°) pour permettre la croissance des colonies de streptocoques et la diffusion dans la gélose des substances inhibitrices (ou stimulantes) que certaines d'entre elles peuvent produire.

Ensuite les boîtes de Pétri sont portées à une température plus élevée (30 ou 37°) de façon à provoquer le développement du lactobacille dans la masse du milieu gélosé. Ce développement se traduit par une opacification uniforme du milieu, sauf autour de certaines colonies de streptocoques qui restent entourées d'une zone claire (zone d'inhibition) ou d'une zone où la croissance du lactobacille est au contraire plus forte (zone de stimulation).

Un certain nombre d'échantillons de lait et de fromages, provenant de différentes régions de France, ont été examinés par cette méthode. 20 à 25% des échantillons renfermaient des streptocoques producteurs de nisine. La proportion des streptocoques

producteurs de nisine par rapport au nombre total de streptocoques lactiques présents dans tous les échantillons examinés est d'environ 2%. En outre beaucoup d'échantillons donnent naissance à des colonies de streptocoques lactiques qui stimulent la croissance des lactobacilles.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions MM. ETAVE et DANÉ de l'Ecole nationale d'Industrie laitière de Surgères, MM. CHARET et LIDOVE de l'Ecole nationale d'Industrie laitière d'Aurillac et M. BLANC PATIN de la Station de Recherches laitières de Poligny qui nous ont fait parvenir les échantillons de lait cru examinés dans ce travail. Nous remercions également M. DELACROIX à Lisieux et M. HOUDOUX à Paris qui nous ont procuré les échantillons de fromage.

#### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] L. A. ROGERS. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bact.*, **16**, 321 à 325, 1928.
- [2] H. R. WHITEHEAD. A substance inhibiting bacterial growth produced by certain strains of lactic streptococci. *Biochem. J.*, **27**, 1793 à 1800, 1933.
- [3] H. R. WHITEHEAD et W. RIDDET. Slow development of acidity in cheese manufacture. *N. Z. J. Agr.*, **46**, 225 à 229. 1933.
- [4] L. J. MEANWELL. The influence of raw milk quality on « slowness » in cheesemaking. *Proc. Soc. Agr. Bact. (Abstr.)*, 19 à 21. 1943.
- [5] G. A. COX et H. R. WHITEHEAD. Streptococci which produce a substance inhibiting the growth of lactic streptococci. *N. Z. J. Agr.*, **52**, 38 à 43. 1936.
- [6] M. HOYLE et A. A. NICHOLS. Inhibitory strains of lactic streptococci and their significance in the selection of culture for starter. *J. Dairy Res.*, **15**, 398 à 408. 1948.
- [7] A. HIRSCH et D. M. WHEATER. The production of antibiotics by streptococci. *J. Dairy Res.*, **18**, 193 à 197. 1951.
- [8] L. E. BARIBO et E. M. FOSTER. The production of a growth inhibitor by lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, **34**, 1136 à 1144. 1951.
- [9] J. S. KOOY et J. W. PETTE. Remming van de groei van Lactaatvergistende Boterzuurbacterien door antibiotica van melkzuurstreptococceen. *Neth. Milk and Dairy J.*, **6**, 302 à 316. 1952.
- [10] A. T. R. MATTICK et A. HIRSCH. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature. Lond.*, **154**, 551. 1944.
- [11] A. T. R. MATTICK. Current research in dairy microbiology in Great Britain. XII<sup>e</sup> Congrès Inter. de Laiterie. Stockholm 7, 203 à 217. 1949.
- [12] A. HIRSCH, E. GRINSTED, H. R. CHAPMAN et A. T. R. MATTICK. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing streptococcus. *J. Dairy Res.*, **18**, 205 à 206. 1951.
- [13] M. McCLINTOCK, L. SERRES, J. J. MARZOLF, A. HIRSCH et G. MOCQUOT.

- Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le développement des sporulés anaérobies dans le fromage de Gruyère fondu. *J. Dairy Res.*, **19**, 187 à 193. 1952.
- [14] J. S. KOOP et J. W. PETTE. Het toepassen van antibiotica afscheidende melkzuurstreptococceen als zuursel bij het tegengaan van boterzuurgisting in kaas. *Neth. Milk and Dairy J.*, **6**, 317 à 322. 1952.
- [15] G. A. COX. A simple method for detecting « non acid » milk. *N. Z. J. Agr.*, **49**, 231 à 234. 1934.
- [16] A. KELNER. A method for investigating large microbial populations for antibiotic activity. *J. Bact.*, **56**, 157 à 162. 1948.
- [17] A. HIRSCH, M. McCLINTOCK et G. MOCQUOT. Observations on the influence of inhibitory substances produced by the lactobacilli of Gruyère cheese on the development of anaerobic spore-formers. *J. Dairy Res.*, **19**, 179 à 186. 1952.
- [18] M. BRIGGS. The classification of Lactobacilli by means of physiological tests. *J. gen. Microbiology*, **9**, 234 à 248. 1953.

## SUPPLÉMENT TECHNIQUE

### L'EMPLOI DE LA CASÉINE COMME STABILISANT DES PEINTURES AU LATEX

par

G. GÉNIN

Ingénieur E. P. C.

Nous avons déjà étudié, dans cette rubrique, l'utilisation de la caséine dans la préparation de stabilisants pour peintures au latex [1]. L'importance qu'ont prise les peintures de ce type dans la décoration moderne et les débouchés importants que constitue pour la caséine la fabrication de ces peintures mérite que l'on revienne à nouveau sur cette question.

C'est en 1949 que les peintures au latex ont fait leur apparition aux Etats-Unis. Le développement des applications de ces peintures a été tel qu'on estime qu'aujourd'hui près de 50% des travaux de peintures effectués à l'intérieur des habitations comportent l'emploi de peintures au latex. Or, depuis peu, ces produits sont également utilisés pour les travaux de protection extérieure des bâtiments et on envisage même de les utiliser pour les peintures industrielles, c'est-à-dire pour la protection des métaux.

En France, l'utilisation de ces peintures a été moins généralisée, mais la création de nouvelles fabriques de latex d'élastomères va mettre à la disposition des utilisateurs français des peintures de ce type.

Initialement, l'expression « latex », lorsqu'on l'appliquait à des produits utilisés dans la préparation des peintures, visait