

ARTICLES ORIGINAUX

Note sur la culture dense en milieu liquide de *Brucella abortus*, souche 19

par P. PERREAU

avec la collaboration technique de Mlle P. GAYT.

Dans un article précédent (3), nous avons décrit un appareil et une méthode permettant d'obtenir des cultures denses de *Pasteurella multocida*, et par conséquent de grosses quantités de suspension bactérienne vaccinale avec le minimum de main-d'œuvre et de temps.

Nous signalions des essais encourageants effectués avec les *Brucella* et les *Salmonella*.

La présente note résume les résultats obtenus en cultivant dans le même appareil et selon le même procédé la souche *Brucella abortus* 19.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

L'appareil utilisé est un « fermenteur » (*) à régulation thermique autonome, non spécialisé et pouvant donc convenir à des cultures de micro-organismes variés.

Nous n'avons fait aucune modification à notre premier montage.

L'aération est toujours faite dans la masse liquide, l'air étant injecté sous la turbine dont les pales pulvérisent les bulles ; les débit d'air moyen est réglé à environ 350 ml par minute et par litre de milieu. La vitesse de rotation de la turbine est de 600 tours/minute.

Le milieu de culture utilisé est celui qui est préconisé par VAN DRIMMELEN (5) et aussi

par STERNE (4) qui l'emploie pour réaliser des cultures dialysées aérées.

En voici la composition telle que nous l'avons adoptée dans un premier temps :

Néopeptone Difco	30 g
Yeast Extract Difco	10 g
Glucose	30 g
Phosphate disodique anhydre	1,5 g
Eau q. s.	1 000 ml

Le pH est ajusté à 6,4 et la stérilisation est effectuée par filtration sur disques Seitz ; il faut insister ici sur le fait que la filtration bactériologique d'un tel milieu est une opération assez laborieuse, mais qui s'exécute sans difficulté si on l'effectue par étapes, avec deux pré-filtrations sur disques de porosité intermédiaire avant la filtration terminale (nous utilisons, dans l'ordre, les disques AW, EK et EKS).

Dans un deuxième temps, nous avons ajouté à ce milieu un extrait de pommes de terre préparé par simple infusion et concentré de façon à pouvoir être utilisé sous un volume réduit ; par la suite, nous avons simplement remplacé l'eau du milieu par l'infusion aqueuse de pommes de terre telle qu'elle est décrite pour la préparation des milieux gélosés servant à la culture des souches de *Brucella* (6), ce qui nous a fourni des résultats encore meilleurs.

Ce milieu mousse abondamment lorsque l'air est insufflé dans la masse liquide, aussi l'emploi d'un anti-mousse est-il indispensable. Nous avons ici aussi employé le « Rhodorsil 426 » qui s'était montré sans action défavorable sur la croissance

(*) Appareil à fermentation TB-25. DOTT. Ing. G. TERZANO et Cie, Milan, Italie.

de *Pasteurella multocida* ; après l'ensemencement, 20 ml d'anti-mousse sont ajoutés aux 15 litres de milieu contenus dans la cuve et suffisent en général à prévenir tout moussage gênant pendant les 24 premières heures de la culture. Ensuite, le Rhodorsil 426 est ajouté par petite quantité (10 ml) une fois par douze heures.

L'inoculum est constitué par une culture de 48 heures de la souche *B. abortus* 19 sur gélose au tryptose Difco additionnée de 10 p. 100 de sérum de cheval ; la récolte d'une boîte de Roux, faite en sérum physiologique, constitue un très bon matériel d'ensemencement.

L'insufflation d'air dans le milieu agité peut être faite immédiatement ou seulement deux ou trois heures après l'ensemencement, sans qu'il s'ensuive des différences notables dans la richesse de la récolte.

Celle-ci peut se faire soit en masse (par lots de 15 à 20 litres de culture), soit en continu avec des récoltes quotidiennes d'environ 10 à 15 litres de suspension microbienne.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La richesse des suspensions récoltées varie souvent d'un lot à l'autre et dans les proportions qui peuvent aller du simple au double, car les facteurs multiples qui interviennent dans la culture ne sont pas tous connus et certains d'entre eux peuvent jouer pour limiter la multiplication bactérienne (le même phénomène s'observe avec les cultures de *P. multocida*).

Le titre minimum que nous avons obtenu au cours de nos essais était de 86 milliards de germes vivants par ml, et le titre maximum de 198 milliards, résultats très comparables à ceux qu'a publiés VAN DRIMMELEN (5).

Notre appareil pouvant contenir 20 litres de culture, il est donc possible de produire, compte tenu d'une richesse moyenne de 150 milliards de germes vivants par ml et d'une norme de 60 milliards de germes par dose vaccinale pour un bovin, avec une seule culture en masse :

$$\frac{20.000 \times 150}{60} = 50.000 \text{ doses de vaccin liquide,}$$

et cela souvent en 48 heures si l'inoculum est copieux et constitué d'une culture jeune (de 2 jours au maximum).

En outre, il est facile, lorsque la croissance microbienne est en pleine phase logarithmique,

de transformer la culture en masse en culture continue et faire ainsi des récoltes quotidiennes, pendant 2 à 3 jours, de 10 à 15 litres de suspension très dense, égale en richesse microbienne à celle que fournit la culture en masse.

Le cycle de culture établi sur une semaine peut se schématiser ainsi : deux jours de culture normale agitée et aérée pour atteindre une forte densité optique, puis deux jours de récolte continue avec apport de milieu neuf et enfin récolte terminale par vidange de la cuve.

Sans difficulté, 45 à 60 litres de culture dense peuvent s'accumuler au bout des 4 jours de fonctionnement de l'appareil, ce qui équivaut à une production hebdomadaire moyenne de plus de 100.000 doses vaccinales.

En matière de production du vaccin *Brucella abortus* souche 19 sur milieu solide, la précaution majeure consiste à éviter toute dissociation des colonies dans le sens S — R afin d'assurer la fixité du pouvoir antigène de la souche et une surveillance constante est donc nécessaire.

La culture des *Brucella* en milieu liquide a été accusée de favoriser l'apparition des mutants R, c'est pourquoi il est toujours recommandé avec insistance d'utiliser des boîtes de Roux dépourvues de tout excès de liquide au moment de l'ensemencement.

Ce qui est vrai en milieu liquide stagnant ne l'est plus en culture agitée et continue. Les formes R n'apparaissent que lorsque les germes commencent à souffrir de conditions nutritives déficientes, en fait quand l'apport de métabolites devient insuffisant pour assurer la continuité de la multiplication.

Nous avons contrôlé, pour chaque lot produit, la qualité satisfaisante des bactéries par l'emploi de deux méthodes très classiques :

1) L'examen des colonies sur milieu au tryptose par transparence en lumière oblique, selon le procédé de HENRY (1) ;

2) L'épreuve de l'acriflavine sur lame et en tube, telle qu'elle est décrite dans les instructions fournies par l'« United States Bureau of Animal Industry » (6) aux préparateurs de vaccin.

En règle constante, aucune colonie R n'est jamais observée dans les cultures denses en masse lorsque la récolte est faite au moment où la courbe de densité optique s'infléchit pour s'établir ensuite en palier ; à ce moment le

milieu est considéré « épuisé », tout au moins certains facteurs vont devenir limitants.

Il en est de même dans la culture continue pour autant que l'apport de milieu neuf soit suffisant.

Au contraire, une culture en masse parvenue à sa densité optique maximum et laissée plusieurs heures en agitation et en aération sans apport de milieu neuf commence à subir une lyse, d'abord légère, importante ensuite, se traduisant essentiellement par une augmentation du pH et une baisse de la densité optique. Simultanément, des mutants R apparaissent, facilement décelables par ensemencement sur milieu solide.

Quant aux risques de contamination des cultures, nous en avons parlé dans un article déjà cité et nous considérons qu'ils sont insignifiants, à la double condition d'une stérilisation correcte du matériel et des milieux et d'une technique bactériologique rigoureuse bien qu'élémentaire.

Les excellents résultats obtenus avec la souche 19 de *Brucella abortus* nous permettent de penser que le même succès peut être obtenu avec d'autres souches de *Brucella* et que cette méthode doit intéresser particulièrement les laboratoires qui préparent des antigènes brucelliques soit dans un but de prophylaxie, soit à des fins d'analyses biochimiques ou d'études immunologiques.

Un point cependant est à ne pas négliger : les souches de *Brucella* sont normalement virulentes et beaucoup de souches dites atténuées ou avirulentes possèdent encore un petit reliquat de pouvoir pathogène. Or une culture agitée et aérée par injection d'air est toujours génératrice d'aérosols microbiens qui peuvent en l'occurrence être assez dangereux.

Nous avons pu, en dirigeant la tubulure d'évacuation d'air de notre fermenteur sur des boîtes de Pétri ouvertes, compter approximativement les germes projetés par le courant gazeux : 15 colonies de *Brucella abortus* 19 pour 10 secondes de projection gazeuse.

Par contre, après barbotage de l'air évacué dans une solution d'hypochlorite de soude, nous n'avons pas pu mettre en évidence ces mêmes germes dans l'environnement immédiat de l'appareil en plein fonctionnement.

Il importe donc, si l'on travaille avec une souche dont on peut craindre un pouvoir pathogène, de prendre certaines précautions :

- 1) Vérifier soigneusement l'étanchéité de la cuve de culture.
- 2) Assurer la stérilisation de l'air évacué, par divers moyens employés seuls ou associés : barbotage dans une solution antiseptique, filtration sur laine de verre ou disque d'amiante, passage dans une gaine à rayons ultra-violet.
- 3) Faire fonctionner l'appareil dans un local clos (chambre-étuve, box stérile, etc...) qu'il est facile de désinfecter le cas échéant.

CONCLUSIONS

La culture dense de *Brucella abortus* souche 19 en milieu liquide est aisément réalisable dans un fermenteur non spécialisé ; nos essais confirment ceux d'autres auteurs (2, 4, 5) et nous ont permis d'obtenir jusqu'à 198 milliards de germes vivants par ml sans que des phénomènes de dissociation soient observés, les bactéries restant en phase S lorsque la culture est correctement conduite.

Pour la production des antigènes brucelliques en général, cette méthode présente, par rapport aux classiques cultures en boîtes de Roux, des avantages considérables et permet surtout de gagner beaucoup de temps.

*Institut d'élevage
et de médecine vétérinaire
des pays tropicaux.*

Laboratoire de microbiologie.

SUMMARY

Note on the concentrated culture in liquid medium of *Brucella abortus*, strain 19

Concentrated cultures of *Brucella abortus* strain 19 in liquid medium are easily prepared in an ordinary fermenter. The results obtained confirm those of other authors (2, 4, 5) and make it possible to reach concentrations as high as 198 milliards of living bacteria per c. c. without visible dissociation phenomena, the bacteria remaining the S phase, providing the culture is properly conducted.

Compared with the current Roux technique for the general production of *Brucella* antigens, this method is considerably more efficient and time-saving.

RESUMEN

Nota sobre el cultivo denso en medio líquido de *Brucella abortus*, especie 19

El cultivo en medio líquido es fácilmente realizable en un fermentador no especializado; nuestras pruebas confirman las de otros autores (2, 4, 5) y nos han permitido obtener hasta 198 mil millones de gérmenes vivos por ml, sin que fenómenos de disociación se hayan observado; las bacterias permanecen en fase S cuando el cultivo es correctamente dirigido.

Para la producción de antígenos brucélicos en general, este método presenta, con relación a los clásicos cultivos en cajas de Roux, ventajas considerables y permite, sobre todo, ganar mucho tiempo.

BIBLIOGRAPHIE

1. HENRY (B. S.). — *J. infect. Dis.*, 1933, **52** : 374.
2. HOFFMANN (F.), SZABO (Mme A.) et SZAKMARY (G.). — **The grown of *Brucella B 19* strain in fermentation apparatus.** *Acta vet. Acad. Sci. Hungaricae*, 1959, **9** (4) : 418.
3. PERREAU (P.). — **La culture dense de *Pasteurella multocida*. Méthode de choix pour la production du vaccin contre la pasteurellose bovine.** *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1961, **24** (2) : 133-40.
4. STERNE. — **The Growth of *Brucella abortus* strain 19 in aerated dialysed media.** *J. gen. Microb.*, 1958, **18** (3) : 747-50.
5. VAN DRIMMELEN (G. C.). — **Strain 19 *Brucella* vaccine : V. Mass production in the *Brucella vortex* aerated culture apparatus.** *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1958, **27** (4) : 539-47.
6. **Préparation du vaccin *Brucella abortus* souche 19.** (Bureau of Animal Industry, U. S. A.). Document du cours-colloque F. A. O. - O. M. S. sur la brucellose, Elisabethville, juin 1958.