

## L'EFFET DE L'AUGMENTATION GRADUELLE DES CONCENTRATIONS DE CHLORURE DE SODIUM SUR LA RÉSISTANCE DES BACTÉRIES LACTIQUES

par

J. RASIC (Belgrade)

Le chlorure de sodium exerce une influence particulière sur l'accroissement et l'activité des bactéries lactiques dans leur fonction propre à mûrir les fromages. C'est la raison pour laquelle de nombreux auteurs, avec des résultats différents, ont examiné la résistance des ferments lactiques au chlorure de sodium en en appréciant l'influence sur la formation d'acide, ainsi que sur l'activité protéolytique [1, 2, 3, 4, 5].

De récentes expériences montrent que le chlorure de sodium accroît son action inhibitrice sur les streptocoques lactiques si l'incubation est pratiquée à la température de 21° C au lieu de 30° C [6]. On nous apprend également que les bactéries lactiques se différencient considérablement au point de vue de la résistance au chlorure de sodium et, qu'en présence de petites quantités de peptone, de lait hydrolysé et de présure, leur résistance augmente [7].

Cependant, l'examen de la résistance des bactéries lactiques au chlorure de sodium que l'on ajoute à la fois par quantités déterminées au lait, n'offre pas l'image réelle des changements ayant trait à la pénétration progressive du sel dans le fromage, au cours de son processus de fabrication et maturation. Le fait d'ajouter des quantités déterminées de sel d'une manière non-graduelle a pour effet de mettre les bactéries en présence d'un facteur défavorable auquel elles sont contraintes de s'adapter vite s'il leur faut continuer leur activité vitale. Quoique l'estimation de la résistance des bactéries lactiques au chlorure de sodium de la manière exposée n'offre pas l'image réelle de leur conduite dans le fromage, elle a une signification biologique, parce qu'elle rend possible la sélection des souches les plus résistantes à ce facteur, lesquelles alors ont plus de chance de résister plus tard dans le fromage aux concentrations moindres avec lesquelles, au cours de la pénétration progressive du sel, elles se mettent en contact.

Dans le but de créer les conditions les plus favorables au rapprochement et au contact lents et progressifs des bactéries lactiques avec les différentes concentrations du sel, de nouvelles études ont été faites. On a ajouté graduellement du chlorure de sodium au lait, à intervalles déterminés et, sur cette base, on a examiné la résistance des streptocoques au point de vue de la formation

de l'acide et de leur multiplication. En même temps, on ajoutait de petites quantités de peptone dans le but d'en évaluer l'effet dans les conditions de l'augmentation graduelle de concentration du sel.

### Expérimentation

La résistance des cultures au chlorure de sodium a été examinée dans le lait qui a été stérilisé dans le pot de Koch et puis refroidi à la température de l'incubation. Une quantité, soigneusement pesée, de chlorure de sodium (A.R.), préalablement stérilisé, a été ajoutée au lait à l'état ferme, remuée légèrement, avant l'inoculation avec la culture. La peptone a été ajoutée sous la forme de solution stérile à 20 p. 100. Des expériences ont été effectuées avec la culture de *Str. lactis* (4 souches) et *Str. paracitrovorus* (3 souches). La multiplication des cultures en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium a été effectuée par la détermination du nombre de colonies en boîte de Petri, en utilisant le milieu de culture d'après Hunter [8].

### Résultat et discussion

En ajoutant du chlorure de sodium dans un intervalle de 4 heures, le taux d'acide, après 24 heures d'incubation à 30° C, a augmenté, par la concentration du chlorure de sodium, de 4 p. 100 en comparaison avec les cas où la même quantité de sel a été ajoutée en une seule fois (fig. 1). Cette différence du taux d'acide avec les variantes à augmentation graduelles de sel atteint 4 p. 100 et davantage. C'est ainsi qu'en présence de 6,5 p. 100 de sel, cette différence montait à un peu moins de deux fois par comparaison

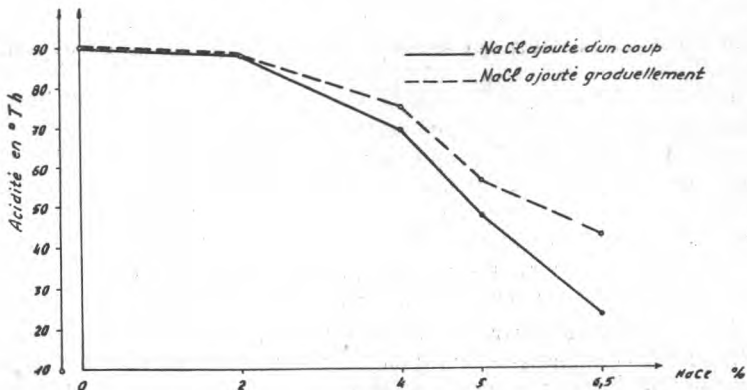


Fig. 1. — Résistance de *Str. lactis* au chlorure de sodium graduellement ajouté au lait (l'intervalle des augmentations du sel est de 4 h. ; 1% inoculum, 30° C., 24 h.).

avec les variantes contenant la même quantité de sel, mais ajouté d'un seul coup.

Ceci établi, la question s'est posée d'expliquer une aussi considérable différence dans le taux d'acide entre les variantes avec et sans augmentation graduelle du sel. Cette différence est-elle apparue en raison de l'existence de l'acide formé, qui aurait été présent avant que la concentration finale du sel ait été atteinte par les augmentations graduelles, ou bien s'agirait-il du nombre accru de cellules de bactéries, ayant pu se former dans les conditions plus favorables que celles qui auraient existé avant l'atteinte de la concentration finale du sel ? Nous avons admis l'hypothèse de l'augmentation du nombre de bactéries, lesquelles, dans ce cas, ont pu créer plus d'acide. Pour vérifier cette supposition, nous avons procédé à de nouvelles expériences.

Les augmentations graduelles du sel comprennent deux variantes. L'acidité de l'une a été réglée après 8 heures d'incubation de telle manière qu'au moyen de N/1 NaOH elle a été amenée au même niveau qu'aux variantes où le sel a été ajouté d'une seule fois. Aux autres variantes, le sel a été ajouté à intervalles déterminés. De cette manière nous avons voulu, autant que possible, éliminer l'effet de l'acide formé avant l'augmentation finale du sel, sur les résultats des titrations comparatives de toutes les variantes. Les résultats de ces expériences sont montrés sur la figure 2.

Comme on le voit, la différence dans le taux d'acide entre les variantes avec augmentation graduelle du sel a été assez petite. Cette différence a été beaucoup plus petite que la différence dans le taux d'acide entre les variantes, c'est-à-dire celle où le sel a été graduellement ajouté et celle où il l'a été d'un seul coup. Les résultats de ces essais montrent que l'effet de l'acide déjà formé

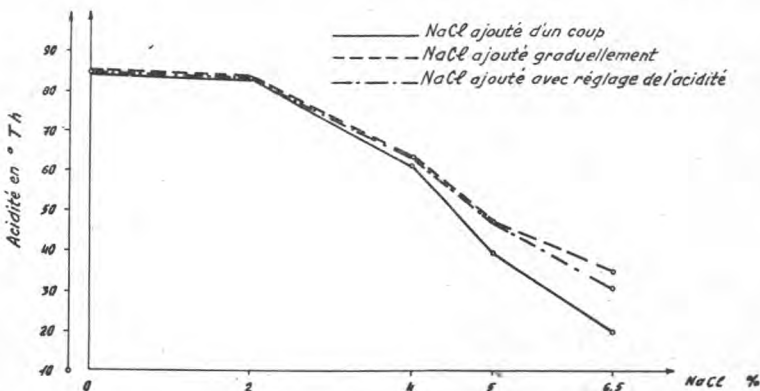


Fig. 2. — Résistance de *Str. lactis* au chlorure de sodium graduellement ajouté au lait avec réglage de l'acidité (l'intervalle des augmentations du sel est de 4 h. ; 1% inoculum, 30° C., 24 h.).

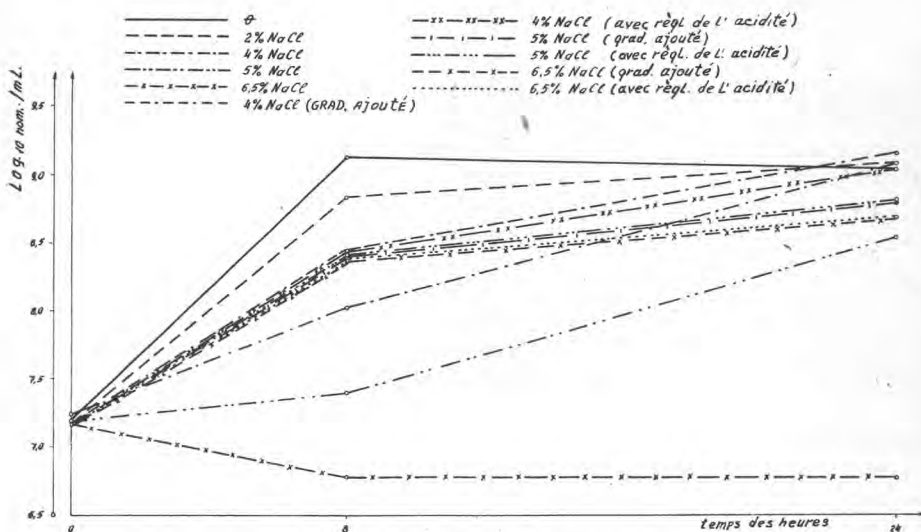


Fig. 3. — Effet du chlorure de sodium graduellement ajouté sur la multiplication de *Str. lactis* dans le lait (1% inoculum, 30° C, 24 h.).

sur le contenu final de l'acide, aux variantes avec augmentation graduelle de la concentration du sel, a été plus petit. On peut affirmer qu'il s'est agi de l'accroissement du nombre des bactéries, en tant que résultat de leur multiplication aux conditions les plus favorables. Faisant suite à cette conclusion, nous avons pu passer à de nouveaux examens, au cours desquels nous nous sommes posé pour objectif de suivre l'accroissement numérique des bactéries dans le courant des 24 heures, nous tenant au même schéma que celui nous ayant permis de suivre l'augmentation du taux d'acide, en déterminant le nombre de bactéries immédiatement après l'inoculation, puis après 8 et 24 heures. Les résultats de ces examens sont montrés sur la figure 3.

Du cours de la courbe, on voit que la différence mutuelle dans le nombre des bactéries entre les variantes avec augmentation graduelle du sel, a été très petite. Ceci est d'ailleurs compréhensible, étant donné que la neutralisation de l'acide par voie de titration à la soude n'a pas pour effet la réduction du nombre des bactéries déjà formées. Si l'on compare l'augmentation numérique des bactéries entre les variantes avec et sans augmentations graduelles du sel, on constate une différence nette après 8 heures d'incubation seulement. C'est ainsi qu'aux variantes où le sel a été ajouté d'un coup, le nombre de bactéries, aux concentrations respectives de 4,5 et 6,5 p. 100 montait à 107,5 ; 26,0 et 6,1 millions/ml., alors qu'aux mêmes variantes, avec augmentations graduelles du sel, ce nombre se fixait à 280,0 millions/ml environ. On remarque

également que la concentration du sel à 2 p. 100 exerce déjà une influence défavorable sur la multiplication des bactéries. A cette concentration, le nombre de bactéries, après 8 heures d'incubation a atteint 700,0 millions/ml, tandis qu'à la variante de contrôle sans addition du sel, ce nombre était de 1 300 millions/ml. Après 24 heures d'incubation, avec l'accroissement du nombre de bactéries à toutes les variantes, on a pu constater que les différences dans le nombre des bactéries entre les variantes, avec et sans augmentations graduelles du sel, ont été plus fortes à mesure que les concentrations s'intensifiaient. C'est ainsi que ces différences ont été les plus frappantes aux concentrations du sel à 6,5 p. 100. La même tendance a été remarquée lors des examens de variations du taux d'acide. De cette manière il est montré que l'effet favorable des augmentations graduelles des concentrations du sel dans le lait sur la formation de l'acide est, généralement, la conséquence de l'accroissement du nombre de bactéries, dans quel cas elles ont été mieux en mesure de résister à l'augmentation des concentrations du sel et de créer plus d'acide.

Des résultats exposés on peut voir que l'effet du chlorure de sodium, à l'occasion de son contact graduel avec les bactéries, est quantitativement différent de celui noté pour les mêmes concentrations du sel résultant du contact brutal. Si l'on a en vue que la pénétration du sel dans le fromage est encore plus lente, compte tenu de l'intervalle des augmentations du sel au cours de nos expérimentations, alors la différence dans la multiplication des bactéries est visible. Il est entendu également qu'en cas d'augmentations graduelles de la concentration du sel, et après un temps déterminé, on arrive, en dépendance des conditions diverses, à une concentration déterminée qui commence à agir défavorablement sur le développement et l'activité des bactéries lactiques exerçant ainsi une sorte de sélection naturelle entre les diverses espèces et souches.

Cependant, le contact progressif des bactéries avec les concentrations du sel augmentées, s'exerce en présence de produits formés par la dégradation des protéines, principalement la peptone. Dans le but d'évaluer l'effet de la peptone sur la résistance des streptocoques dans les conditions de l'augmentation graduelle des concentrations du chlorure de sodium, nous avons effectué de nouvelles expériences. Les résultats en sont montrés sur la figure 4.

Comme on le voit, l'augmentation graduelle du sel, en présence de peptone, a causé une augmentation plus rapide du taux d'acide de la part de *Str. lactis* à toutes les concentrations, de même que dans les variantes où le sel a été ajouté d'un coup sans peptone, on remarque le moindre taux d'acide. Ces résultats sont en harmonie avec ceux de nos expérimentations antérieures, suivant lesquelles les petites quantités de peptone influent indirectement

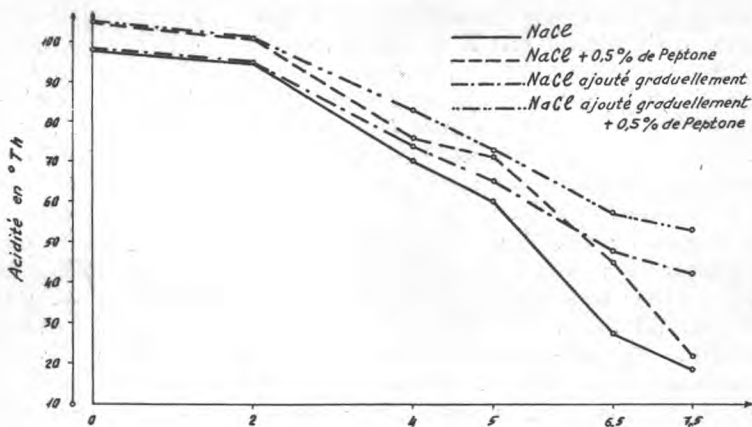


Fig. 4. — Effet de la peptone sur la résistance de *Str. lactis* au chlorure de sodium graduellement ajouté au lait (l'intervalle des augmentations du sel est de 4 h. ; 1% inoculum, 30° C., 48 h.).

sur l'augmentation de la résistance des bactéries lactiques au chlorure de sodium [7]. Les variantes où le chlorure de sodium a été ajouté d'un coup, mais avec la peptone, ont montré un taux d'acide supérieur, jusqu'à la présence de 5 p. 100 de chlorure de sodium, en comparaison avec les variantes où le chlorure de sodium a été graduellement ajouté sans peptone, dans quel cas les dernières variantes aux concentrations du sel de 6,5 p. 100 et 7,5 p. 100 ont montré un taux d'acide plus grand. Le cours de la courbe sur la figure montre cela clairement. On remarque particulièrement la tendance à la formation de l'acide aux variantes avec et sans augmentations graduelles du sel en présence de peptone et sans elle, si l'on suit le cours de la courbe à la concentration du sel de 5 p. 100 et plus. La chute consécutive du taux d'acide dans les variantes avec augmentations graduelles de la concentration du sel montre l'intérêt de l'évaluation de la résistance des streptocoques par ce procédé.

Les examens de résistance des cultures du *Str. paracitrovorus* à l'augmentation graduelle du chlorure de sodium, avec et sans peptone, ont montré des différences semblables dans le taux d'acide à celles de *Str. lactis*. Les résultats de ces examens sont indiqués sur la figure 5. Comme on le voit, l'effet du chlorure de sodium, graduellement ajouté, sur le taux d'acide de la culture de *Str. paracitrovorus*, n'est pas très expressive. Beaucoup plus évident a été l'effet de la peptone sur la formation d'acide en présence du sel, sans égard avec la manière selon laquelle la concentration donnée a été atteinte. Autre chose à remarquer est l'augmentation visible du taux d'acide s'étant formé uniquement avec une concentration du sel égale à 2 p. 100, alors qu'à la concen-

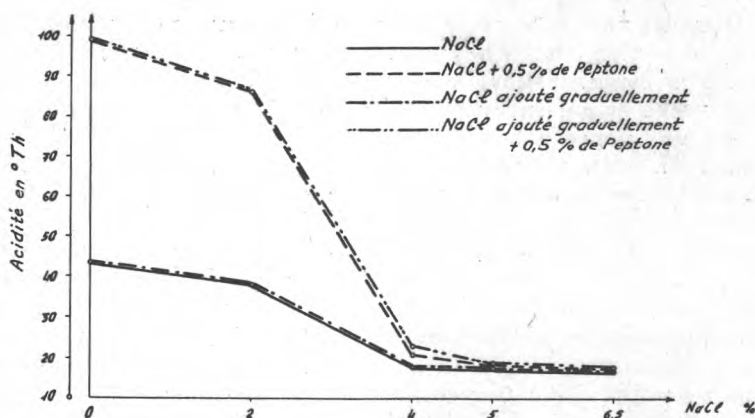


Fig. 5. — Effet de la peptone sur la résistance de *Str. paracitrovorus* au chlorure de sodium graduellement ajouté au lait (l'intervalle des augmentations du sel est de 4 h. ; 1% inoculum, 30° C., 48 h.).

tration supérieure de 4 p. 100 une forte dépression s'est produite. Nous avons supposé que l'effet insignifiant de l'augmentation graduelle de la concentration du sel sur la formation de l'acide de la culture *Str. paracitrovorus* a été le résultat d'une multiplication plus lente de la culture, se différenciant ainsi du *Str. lactis*. C'est pour cela que nous avons prolongé l'intervalle des augmentations du sel à 12 heures au lieu de 4. Les résultats de ces examens, indiqués sur la figure 6, montrent l'effet évident de l'augmentation graduelle du sel sur la formation d'acide, avec et sans peptone.

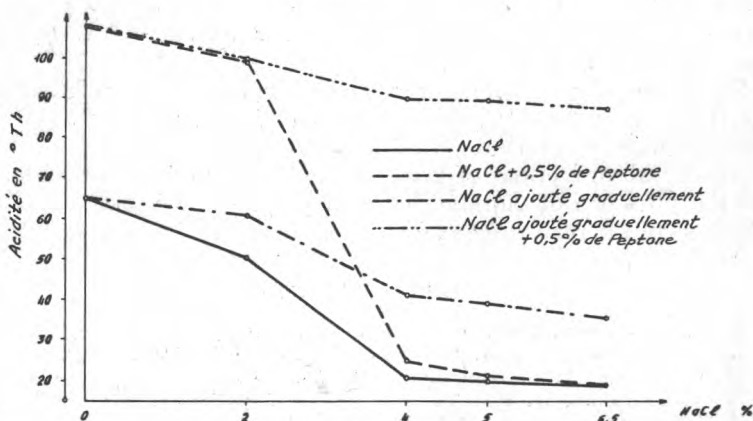


Fig. 6. — Effet de la peptone sur la résistance de *Str. paracitrovorus* au chlorure de sodium graduellement ajouté au lait (l'intervalle des augmentations du sel est de 12 h. ; 1% inoculum, 30° C., 72 h.).

Dans les variantes où le chlorure de sodium et la peptone ont été ajoutés d'un coup, l'augmentation du taux d'acide a été visible jusqu'à la concentration de 2 p. 100 de sel, et suivie d'une forte dépression à la concentration de 4 p. 100. L'augmentation graduelle du sel sans peptone a montré un mouvement de la courbe plus régulier du taux d'acide, lequel a lentement décrû avec l'accroissement de la concentration du sel. Comme on le voit sur la figure 6, ces cultures ont pu créer l'acide lors de l'augmentation graduelle de la concentration du sel dans le lait au cours de 48 heures, même à la concentration de 6,5 p. 100, laquelle, par augmentation brusque, s'est révélée inhibitrice. Il va de soi que l'on ne peut s'attendre au développement des cultures de *Str. paracitrovorus* et à leur activité, lors d'augmentation graduelle de la concentration du sel, que jusqu'à la formation des concentrations auxquelles ces bactéries ne peuvent que très difficilement, ou pas du tout, se développer.

Comme on le voit, la résistance des bactéries lactiques au chlorure de sodium doit être considérée à la lumière des augmentations graduelles de sa concentration ; elle se forme par le sel et en présence de produits créés par la dégradation des protéines, tels que la peptone et des acides aminés. Ainsi considérée, la résistance des bactéries lactiques change de sens, bien que la différence entre les diverses espèces et souches continue de s'affirmer à ce point de vue.

#### SUMMARY

Results of investigations on the resistance of lactic acid bacteria to gradually increased concentrations of sodium chloride show the following :

The gradually increased concentrations of sodium chloride in the milk caused a more rapid growth and acid production of lactic streptococci cultures, than when the same salt concentrations were achieved at once.

The effect of gradually increased sodium chloride concentrations was the same with *Str. paracitrovorus* cultures, but it was necessary to increase interval of salt addition.

The combined effect of gradually additions of sodium chloride and the presence of peptone in a small quantity has the greatest influence on the resistance of lactic acid bacteria to sodium chloride.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. M. MUSKOTEN. 1930. *Milchw. Forsch.*, 9, 51.
- [2] E. H. McDOWALL, L. A. WHELAN. 1933. *J. Dairy Res.*, 5, 42.
- [3] M. CLAUSSEN. 1937. *Zentr. f. Bakt.*, 96, 164.
- [4] W. HENNEBERG, H. KNIEFALL. 1936. *Milchw. Forsch.*, 17, 146.
- [5] A. SOKOLJSKAJA. 1955. *Mol. Prom.*, 2, 19.
- [6] E. H. MARTH, R. V. HUSSONG. 1963. *J. Dairy Sci.*, 46, 609.
- [7] J. RASIC. 1962. XVI Int. Dairy Congr., B, 881.
- [8] J. E. HUNTER. 1946. *J. Dairy Res.*, 14, 283.