

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA FLORE MICROBIENNE DU FROMAGE DE TYPE SAINT-PAULIN

II. SES ESPÈCES DOMINANTES

par

A. DUCASTELLE (1) et J. LENOIR

Laboratoire de Technologie

Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Grignon (S.-et-O.)

Introduction

Dans une note antérieure nous avons étudié l'importance relative des grands groupes microbiens appartenant à la flore du fromage de type Saint-Paulin et précisé l'évolution de ces groupes au cours de la maturation. Nous avons observé que les bactéries du levain, streptocoques essentiellement, constituent la flore dominante du fromage à tous les stades de l'affinage. Les lactobacilles et les levures restent relativement peu nombreux ; quant aux microcoques, apportés surtout par la saumure de salage, ils se développent au cours de l'affinage et forment en fin de maturation une part notable de la microflore totale [8].

Cette étude ne donnait toutefois qu'une image globale et incomplète de la flore microbienne du fromage. Afin de mieux connaître celle-ci il nous a paru utile de déterminer quelles étaient les espèces microbiennes représentatives de chacun des groupes dénombrés.

Protocole expérimental

A. — *Isolement des souches*

Les isollements ont été effectués à partir d'une série de 6 échantillons ayant atteint des stades de maturation différents. Sur chaque échantillon, comportant 2 fromages, les groupes microbiens suivants ont été dénombrés par ensemencement sur milieux sélectifs : les streptocoques, les lactobacilles, les microcoques et autres bactéries halophiles, les levures [8].

Afin d'obtenir une image aussi représentative que possible de la flore, 60 souches de chaque groupe microbien ont été isolées, 10

(1) Centre de troisième cycle de Science du Lait.

souches par échantillon. Cependant, en raison de leur faible importance numérique, 24 souches seulement de lactobacilles ont été retenues.

Une colonie, prélevée au hasard sur la boîte convenable de milieu sélectif, est ensemencée sur bouillon nutritif et le milieu est mis à incuber 24 h à 30° C. Sur la culture obtenue, un nouvel isolement est effectué par ensemencement en stries à la surface d'une gélose nutritive. Une colonie isolée est ensuite ensemencée en milieu liquide et celui-ci est mis à incuber 18 h à 30° C. La culture pure obtenue est repiquée sur milieu gélosé et, après développement, conservée à + 4° C.

B. — *Caractérisation des souches*

Avant de procéder à la caractérisation de l'espèce, chaque souche est ensemencée 2 fois, à 24 heures d'intervalle, sur bouillon nutritif et les milieux d'identification sont inoculés avec une culture de 24 heures. Sur les cultures bactériennes, un examen microscopique avec coloration de Gram et une recherche de catalase ont permis de confirmer le classement des souches dans les groupes streptocoques, lactobacilles ou microcoques.

1) *Streptocoques et lactobacilles*

Pour l'identification de ces deux groupes bactériens les caractères physiologiques et biochimiques suivants (1, 14, 13) ont été étudiés :

- *Production de gaz à partir du glucose* ;
- *Désamination de l'arginine* ;
- *Croissance à diverses températures* : 10 et 45° C pour les streptocoques ; 15, 45 et 48° C pour les lactobacilles ;
- *Thermorésistance* : à 63° C - 30 mn pour les streptocoques ; à 60° C — 90 mn et 65° C — 30 mn pour les lactobacilles ;
- *Résistance à diverses concentrations en chlorure de sodium* : 2, 3, 4 et 6,5 p. 100 pour les streptocoques ; 2, 4 et 6 p. 100 pour les lactobacilles ;
- *Action sur le lait tournesolé* (uniquement pour les streptocoques) ;
- *Fermentation des sucres* : glucose et maltose pour les streptocoques ; glucose, saccharose, mannitol et raffinose pour les lactobacilles ;
- *Production d'acétone* sur milieu citrate-lactose (seulement pour les streptocoques) ;
- *Acidité titrable* développée sur le lait autoclavé (uniquement pour les lactobacilles).

2) *Microcoques et autres bactéries halophiles*

De nombreuses clés ont été proposées pour l'identification des coques à coloration de Gram positive et producteurs de catalase

[9], [5], [2], [15], [6], [4]. Nous avons adopté la récente classification de Baird-Parker [4] qui, dans le genre *Micrococcus*, distingue deux groupes sur la base de l'aptitude à la fermentation ou à l'oxydation du glucose, les staphylocoques et les microcoques. Les premiers produisent de l'acide en anaérobiose à partir du glucose ; les seconds ne possèdent pas cette propriété. Le groupe des staphylocoques comprend 6 sous-groupes ; celui des microcoques 7.

La classification en groupes et sous-groupes est fondée sur les caractères suivants : [9], [2], [15], [4]

— *Aptitudes à l'oxydation et à la fermentation des sucres* [10]

Par ensemencement sur milieu nutritif gélosé à 0,2 p. 100 et contenant 1 p. 100 du sucre étudié on recherche l'aptitude à la production d'acide en aérobie à partir du glucose, du mannitol, du lactose, de l'arabinose et du maltose.

Sur des tubes du même milieu recouvert d'un disque de paraffine on met en évidence l'aptitude à la fermentation du glucose et du mannitol en anaérobiose.

— *Production de coagulase*

A 0,3 ml de plasma de lapin on additionne 0,1 ml d'une culture de 24 heures sur milieu « Brain Heart Infusion » (Difco B 37) ; le mélange est mis à incuber à 37° C et examiné après 1 heure et 3 heures.

— *Production de phosphatase*

Les souches sont ensemencées sur milieu gélosé additionné de 0,1 pour 1 000 de phénolphtaléine-phosphate disodique ; après incubation la libération de phénolphtaléine est décelée en atmosphère ammoniacale.

— *Production d'acétoïne à partir du glucose*

— *pH final* sur milieu glucosé à 2 p. 100 après 15 jours d'incubation à 30° C.

— *Croissance à 10° C.*

En outre, certains caractères distinctifs utilisés dans la classification de Bergey [5] ont été étudiés :

- Production de nitrites à partir des nitrates ;
- Utilisation du phosphate d'ammonium comme unique source d'azote ;
- Hydrolyse de l'urée ;
- Action sur le lait tournesolé ;
- Liquéfaction de la gélatine ;
- Digestion de la caséine.

3) *Levures*

Les caractères suivants [11] ont été étudiés :

— *Aptitude à la sporulation* :

Les résultats obtenus sur les cultures en milieux pauvres traditionnels, gélose de Gorodkova et blocs de plâtre, étaient souvent difficilement interprétables. Pour la plupart des souches, l'aptitude à la formation de spores a été recherchée sur des cultures âgées en eau de malt.

— *Aspect des cultures en milieu liquide :*

Présence d'un voile ou d'un dépôt en cultures plus ou moins âgées.

— *Morphologie de la cellule ;*

— *Aspect et forme des colonies sur milieu gélosé ;*

— *Aptitudes à la fermentation et à l'assimilation des sucres :* glucose, saccharose, maltose, lactose et galactose.

Résultats

I. — *Streptocoques*

Sur les 60 souches isolées à partir du milieu à l'acétate de thallium, 58 présentent les caractères de streptocoques : formes en diplocoques et streptocoques, coloration de Gram positive, absence de catalase.

Ces 58 souches se répartissent comme suit :

49 souches s'identifient à l'espèce *Str. lactis* par l'ensemble de leurs caractères : croissance à 10° C et non à 45° C, réduction du lait tournesolé avant coagulation, non thermorésistance, tolérance à 4 p. 100 de sel mais non à 6,5 p. 100, désamination de l'arginine, fermentation du maltose.

7 souches s'apparentent à l'espèce *Str. diacetylactis*, elles présentent les caractères précédents mais, en outre, elles produisent de l'acétoïne en milieu citraté.

2 souches se rattachent aux streptocoques du groupe D par leur thermorésistance, leur croissance à 10 et 45° C, leur tolérance au chlorure de sodium (6,5 p. 100).

2 souches présentent une réaction positive à l'épreuve de la catalase, elles n'appartiennent pas au groupe des streptocoques. 1 souche s'apparente au groupe des microcoques, 1 se rattache au genre *Bacterium*.

II. — *Lactobacilles*

Ce groupe microbien ne représente, dans la flore du Saint-Paulin, qu'une population très peu nombreuse [8]. Les 24 souches étudiées appartiennent au genre *Lactobacillus*, elles sont en forme de bâtonnets à coloration de Gram positive et elles ne produisent pas de catalase.

Ces 24 souches se répartissent en 23 souches homofermentaires et une souche hétérofermentaire.

Les souches homofermentaires présentent les caractères de *L. planrarum*, elles se développent à 15° C et ne produisent qu'une petite quantité d'acide lactique (0,5 p. 100).

La souche hétérofermentaire se rattache, par ses caractères de culture, à l'espèce *L. brevis*.

III. — *Microcoques et autres bactéries halophiles*

Sur les 60 souches isolées, 51 se classent dans le genre *Micrococcus*, elles sont en forme de coques à coloration de Gram positive et elles produisent de la catalase.

31 souches sont aptes à fermenter le glucose en milieu anaérobie, elles se rattachent au groupe des staphylocoques, 20 souches ne possèdent pas cette propriété, elles appartiennent au groupe des microcoques [4].

Les 31 souches du groupe des staphylocoques se répartissent ainsi (fig. 1) :

- 4 souches se rattachent au sous-groupe II ;
- 4 souches appartiennent au sous-groupe III ;
- 23 souches s'apparentent au sous-groupe VI ;

La répartition des 20 souches du groupe des microcoques est la suivante (fig. 1) :

- 1 souche se classe dans le sous-groupe II ;
- 2 souches appartiennent au sous-groupe III ;
- 2 souches se rattachent au sous-groupe IV ;
- 15 souches s'apparentent au sous-groupe V.

Il semble difficile d'établir une relation entre la classification de Baird-Parker et celle de Bergey [3]. Des souches présentant les caractères d'une espèce type selon Bergey peuvent en effet se classer d'après Baird-Parker dans des groupes et des sous-groupes différents.

Sur la base des caractères distinctifs des espèces du genre *Micrococcus* [3], les souches étudiées se répartissent en 8 espèces différentes. Certaines espèces sont toutefois dominantes. Ainsi *M. caseolyticus* et *M. conglomeratus* représentent près de la moitié des souches caractérisées.

Les 9 souches isolées sur milieu de Chapman et non classées dans le genre *Micrococcus* appartiennent au genre *Bacterium*, elles s'apparentent à l'espèce *B. linens*.

IV. — *Levures*

Les 60 souches de levures isolées, se répartissent en 3 grands groupes :

30 souches s'apparentent au genre *Saccharomyces* par leur aptitude à la sporulation et leur pouvoir fermentaire. 25 souches

fermentent le glucose, le saccharose, le maltose et le galactose, mais non le lactose, elles se rattachent à l'espèce *S. cerevisiae*; 5 souches fermentent le glucose, le saccharose, le lactose et le galactose mais non le maltose, elles appartiennent au groupe des levures du lactose et sont proches de l'espèce type *S. fragilis*.

28 souches asporogènes ne présentent qu'un pouvoir fermentaire peu étendu, par leurs caractères de culture elles se rattachent au groupe des *Candida* typiques.

2 souches pigmentées et dépourvues de pouvoir fermentaire s'apparentent au groupe des *Rhodotorula*.

Discussion

La flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin apparaît essentiellement constituée par les bactéries originaires du levain. Dans une étude précédente [8], nous avons dénombré environ 500 millions de streptocoques par gramme de caillé. Ces germes forment une population relativement homogène; ce sont des streptocoques lactiques homofermentaires qui se répartissent entre les 2 espèces, *Str. lactis* et *Str. diacetylactis*; la première, largement dominante, représente près de 90 p. 100 de la flore lactique. La fonction principale de ces bactéries est de produire de l'acide lactique aux dépens du lactose; *Str. diacetylactis* possède en outre la propriété de former de l'acétoïne à partir des citrates et peut ainsi contribuer au développement de l'arôme du fromage. Par ailleurs, nous avons constaté qu'un nombre important de streptocoques meurt au cours de la maturation. Or, *Str. lactis* est doté d'enzymes intracellulaires actives sur les protéines [16]. Cette espèce joue sans doute un rôle important dans la dégradation des matières azotées du fromage. Un tel rôle peut également être attribué aux streptocoques du groupe D. Ces germes ne représentent qu'une faible proportion de la population en streptocoques mais leur nombre dans le fromage n'est pas négligeable, et l'on sait que *Str. faecalis* peut, par son action protéolytique, avoir un effet bénéfique sur l'affinage [7].

Les lactobacilles ne sont guère représentés que par une seule espèce, *L. plantarum*. Très peu nombreux dans les fromages étudiés, ces germes n'exercent vraisemblablement qu'un rôle mineur au cours de la maturation.

Assez abondante, surtout en fin d'affinage, la population en microcoques est beaucoup plus hétérogène que les précédentes. La classification de Baird-Parker compte 13 sous-groupes, 7 sont représentés dans la pâte des fromages examinés. Toutefois, 2 sous-groupes sont dominants, le sous-groupe VI des staphylocoques et le sous-groupe V des microcoques; ces 2 sous-groupes rassemblent près de 75 p. 100 des souches classées dans le genre *Micrococcus*.

Sur les 51 souches caractérisées, 11, soit près de 20 p. 100 de la population, ont la propriété d'hydrolyser activement la caséine sur

milieu gélose au lait. Le fromage contient donc un nombre important de germes fortement protéolytiques, de l'ordre de 1 million par gramme de pâte en fin de maturation. Enfin, on constate qu'une forte proportion, 70 p. 100 environ, des microcoques isolés produisent de l'acétoïne à partir du glucose.

Outre les microcoques on relève, parmi les bactéries isolées sur milieu de Chapman, un nombre relativement important de germes apparentés à l'espèce *Bacterium linens*. Par leur intense activité protéolytique, ces bactéries peuvent jouer un rôle appréciable dans la maturation.

Les levures ne sont présentes dans les fromages étudiés qu'en nombre assez faible, 10^3 à 10^4 par gramme de pâte. Les souches apparentées aux genres *Saccharomyces* et *Candida* dominent largement et chacun de ces groupes forme près de 50 p. 100 de la population. Par contre, la proportion de levures du genre *Rhodotorula* apparaît très réduite. Cette dernière constatation n'est guère en accord avec des observations antérieures effectuées sur des fromages de Saint-Paulin affinés de diverses origines [12]. Les levures isolées à partir de ces échantillons appartenaient toutes au genre *Rhodotorula*. Il est assez vraisemblable que le peuplement en levures des fromages de type Saint-Paulin peut être différent d'une usine à l'autre, en raison notamment des conditions d'implantation de ces microorganismes. Les levures du genre *Saccharomyces* se trouvent probablement introduites par l'intermédiaire du milieu ambiant. Les levures des genres *Candida* et *Rhodotorula* proviennent sans doute, en grande partie, de la saumure. Nous avons en effet constaté sur un certain nombre de souches isolées à partir de la saumure que toutes se rattachaient aux groupes *Candida* ou *Rhodotorula* ; en outre la présence de ces types de levures n'a été mise en évidence que sur des caillés ayant subi l'opération du salage.

Conclusion

Il apparaît que 2 groupes de microorganismes sont présents en nombre suffisant dans les fromages étudiés pour jouer un rôle déterminant dans l'affinage de la pâte, notamment dans la dégradation des matières azotées. Les streptocoques lactiques, dont le nombre diminue dans une proportion très importante au cours des 10 premiers jours de maturation, doivent libérer des enzymes intracellulaires. Les microcoques, qui se développent au cours de l'affinage, doivent excréter des exoenzymes.

Afin de préciser la part de ces agents dans la maturation du fromage il reste à déterminer quelles sont les activités respectives des uns et des autres.

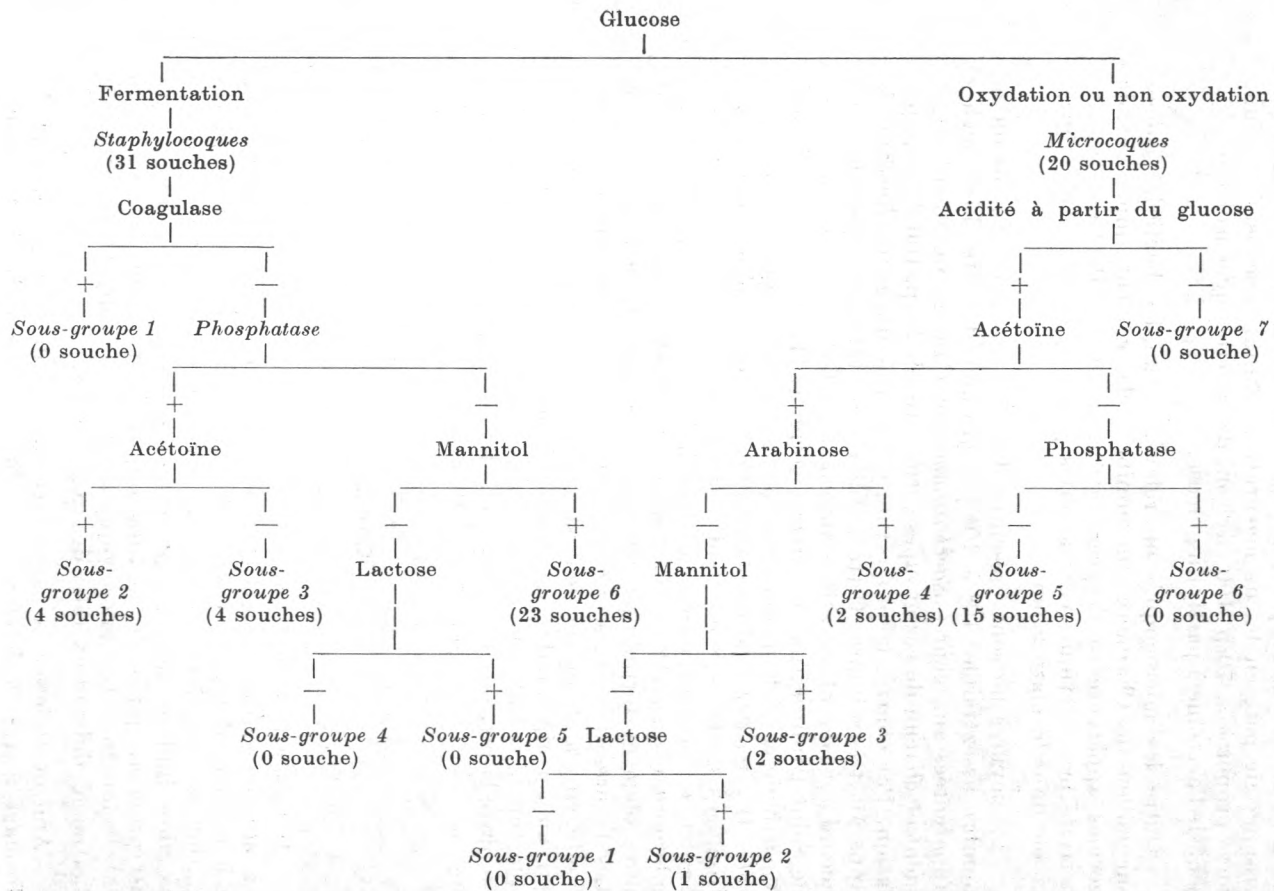


Fig. 1 — Répartition des microcoques isolés du Saint-Paulin d'après la classification de Baird-Parker

Résumé

Sur 6 échantillons de fromages de type Saint-Paulin, prélevés dans une même usine à des stades de maturation différents, 58 souches de streptocoques, 24 souches de lactobacilles, 51 souches de microcoques et 60 souches de levures ont été isolées.

Parmi les streptocoques 49 souches s'identifient à l'espèce *Str. lactis*, 7 souches à l'espèce *Str. diacetylactis*, 2 souches s'apparentent aux streptocoques du groupe D.

Dans le groupe des lactobacilles 23 souches homofermentaires se rattachent à l'espèce *L. plantarum*, une souche hétérofermentaire à l'espèce *L. brevis*.

Parmi les microcoques, et sur la base de la classification de Baird-Parker, 31 souches appartiennent au groupe des staphylocoques, elles se répartissent en 3 sous-groupes, 23 s'apparentent au sous-groupe VI. 20 souches appartiennent au groupe des microcoques, elles se répartissent en 4 sous-groupes, 15 se rattachent au sous-groupe V. Sur la base de la classification de Bergey les souches se répartissent en 8 espèces différentes.

Les levures se classent en 4 groupes. 25 souches s'apparentent à l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*, 5 souches à l'espèce *S. fragilis*, 28 souches se rattachent au groupe des *Candida* typiques, 2 souches au genre *Rhodotorula*.

Summary

From 6 samples of cheeses type Saint-Paulin, coming from a same plant at different maturation stadia, 58 strains of streptococci, 24 strains of lactobacilli, 51 strains of micrococci and 60 strains of yeasts have been isolated.

Among the streptococci, 49 strains are identified with *Str. lactis*, 7 strains with *Str. diacetylactis*, 2 strains with streptococci of the D group.

In the lactobacilli group, 23 homofermentative strains belong to the specy *L. plantarum*, one heterofermentative strain to the specy *L. brevis*.

Among the micrococci and according to the Baird-Parker's classification, 31 strains are classed in the staphylococci group, they are distributed in 3 subgroups, 23 strains belong to sub group VI. 20 strains are classed in the micrococci group, they are distributed in 4 subgroups, 15 strains belong to subgroup 5. According to the classification in Berger's Manual, strains are classed in 8 different species.

Yeasts are distributed in 4 groups 25. strains belong to the specy *Sacch. cerevisiae*, 5 strains to the specy *Sacch. fragilis*, 28 strains are classed in the typical *Candida* group, 2 strains in the genus *Rhodotorula*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Y. ABD-EL-MALEK, T. GIBSON. — Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk. *J. Dairy Res.*, 1948, **15**, 233-248.
- [2] Y. ABD-EL-MALEK, T. GIBSON. — Studies in the bacteriology of milk. II. The staphylococci and micrococci of milk. *J. Dairy Res.*, 1948, **15**, 249-260.
- [3] A. C. BAIRD-PARKER. — The occurrence and enumeration, according to a new classification, of micrococci and staphylococci in bacon and on human and pig skin. *J. Appl. Bact.*, 1962, **25**, 352-361.
- [4] A. C. BAIRD-PARKER. — A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.*, 1963, **30**, 409.
- [5] R. S. BREED, E.G.D. MURRAY, A. P. HITCHENS. — *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th ed., The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1948.
- [6] S. T. COWAN. — An introduction to chaos, or the classification of micrococci and staphylococci. *J. Appl. Bact.*, 1962, **25**, 324-340.
- [7] A. C. DAHLBERG, F. V. KOSIKOWSKI. — The development of flavor in american Cheddar cheese made from pasteurized milk with *Streptococcus faecalis* starter. *J. Dairy Sci.*, 1948, **31**, 275-284.
- [8] A. DUCASTELLE, J. LENOIR. — Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. I. Son évolution au cours de la maturation. *Le Lait*, 1965, **45**, 371-378.
- [9] G. J. HUCKER. — Studies on the Coccaceae II. A study of the general characters of the micrococci. *Techn. Bull.*, N.Y., St. Agr., exp. Sta., n° 100, 1924.
- [10] R. HUGH, E. LEIFSON. — The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bact.*, 1953, **66**, 24-26.
- [11] J. LODDER, KREGER-VAN RIJ. — *The yeasts, a taxonomic study*. North Holland Publish. Co, Amsterdam, 1952.
- [12] J. F. MARCERON, J. LENOIR, R. VEISSEYRE. — Contribution à l'étude de l'activité protéolytique de la flore microbienne du fromage de type Saint-Paulin. A paraître in *C. R. XVII^e Congrès International de Laiterie*, 1966.
- [13] G. MOCQUOT. — Les bactéries lactiques. Cours du Centre d'Enseignement et de Recherches de Bactériologie Alimentaire, Institut Pasteur de Lille, 1957.
- [14] M. ROGOSA, M. E. SHARPE. — An approach to the classification of the lactobacilli. *J. Appl. Bact.*, 1959, **22**, 339-340.
- [15] C. SHAW, J. M. STITT, S. T. COWAN. — Staphylococci and their classification. *J. Gen. Microbiol.*, 1951, **5**, 1010-1023.
- [16] W. C. VAN DER ZANT, F. E. NELSON. — Characteristics of an endocellular proteolytic enzyme system of *Streptococcus lactis*. *J. Dairy Sci.*, 1953, **36**, 1212-1222.