

## La flore microbienne du fromage de Roquefort

### IV. - Les entérocoques

par

J. J. DEVOYOD

*Station Centrale de Recherches Laitières et de Technologie des Produits  
Animaux, I.N.R.A. (78) Jouy-en-Josas*

(avec la collaboration technique de Marie-Josèphe LAPIERRE)

### INTRODUCTION

Lors d'études précédentes sur l'évolution de la flore microbienne du fromage de Roquefort (Devoyod *et al.*, 1966 et 1968), nous avons constaté la présence d'entérocoques aussi bien dans le lait qu'à différents stades de la fabrication. On a cherché dans le présent travail à étudier quelle était, dans le cas d'une fabrication traditionnelle, l'évolution des entérocoques dans le fromage de Roquefort et à quelles espèces ils appartenaient. Nous avons isolé un certain nombre de souches d'entérocoques aux différents stades de la fabrication et, en plus des caractères biochimiques d'identification de ces souches, nous avons plus particulièrement étudié les caractères susceptibles de présenter un intérêt en technologie fromagère.

### MATERIEL ET METHODES

#### a) Fabrication

Quarante-cinq fromages ont été fabriqués le même jour à partir de 525 l de lait cru de brebis, dans une laiterie de la Société des Caves de Roquefort. L'emprésurage, le travail du caillé, la mise en moules, le salage et l'affinage ont été effectués selon les méthodes traditionnelles en usage à Roquefort, méthodes décrites par Mocquot et Bejambes (1960).

#### b) Echantillons

Les échantillons de lait ont été prélevés juste avant l'emprésurage, les échantillons de lactosérum et de caillé avant la mise en moules. Les échantillons de fromage ont été prélevés aux stades suivants de la fabrication :

a) 24 h après l'emprésurage ; b) 48 h après l'emprésurage (fromages en « salle chaude » à 18° C) ; c) 5 j après l'emprésurage (fromages en « salle froide » à 10° C) ; d) avant salage (soit au 10<sup>me</sup> j) ; e) après salage (soit au 15<sup>me</sup> j) ; f) après 10 j d'affinage à 8 - 9° C (25<sup>me</sup> j) ; g) après 20 j d'affinage à 8 - 9° C, avant que les fromages soient mis sous feuilles d'étain (35<sup>me</sup> j) ; h) après 55 j d'affinage (70<sup>me</sup> j) et i) après 85 j d'affinage (100<sup>me</sup> j). On prélevait, chaque fois sur un nouveau fromage, trois échantillons : deux échantillons de la surface du fromage par grattage de chacune des faces et, à l'aide d'une sonde, un échantillon au centre du fromage.

### c) Dénombrements

Le dénombrement des entérocoques dans les échantillons de lait et de fromage a été effectué en utilisant le milieu de Packer (1943) modifié par Mossel *et al.* (1957), milieu de composition suivante : tryptose 1,5 p. 100 ; extrait de viande 0,3 p. 100 ; chlorure de sodium 0,5 p. 100 ; gélose 1,5 p. 100 ; sang de mouton 5 p. 100 ; violet cristal 0,0002 p. 100 et azide de sodium 0,05 p. 100. Les germes totaux étaient dénombrés sur gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479). En plus des entérocoques et des germes totaux, nous avons dénombré les bactéries coliformes sur gélose au désoxycholate de sodium (Desoxycholate Agar Difco n° 420), les levures sur gélose à l'extrait de pomme de terre (Potato Dextrose Agar Difco n° 13), les staphylocoques et les microcoques sur milieu de Chapman.

### d) Isolement et identification

Pour chaque échantillon, 5 à 10 colonies qui s'étaient développées sur le milieu de Mossel ont été repiquées sur le milieu de Lubert et Frazier (1955) modifié, de composition suivante : glucose 0,5 p. 100 ; bactotryptone 1 p. 100 ; bacto-yeast-extract 0,5 p. 100 ; phosphate bipotassique 0,2 p. 100 ; chlorure de sodium 0,5 p. 100 ; pH = 7. C'est ce même milieu que nous avons utilisé comme « milieu de base » pour l'étude de certains caractères biochimiques d'identification. Après purification, les souches étaient conservées à + 4° C sur gélose inclinée.

Les caractères d'identification suivants ont été étudiés :

#### 1) Morphologie

L'examen microscopique était effectué, après coloration au bleu de méthylène (solution alcoolique à 0,6 p. 100) d'un frottis d'une culture sur bouillon de 16 h à 37° C.

#### 2) Production de catalase

Une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes était déposée sur une colonie développée sur gélose nutritive pendant 24 h à 37° C afin d'observer la formation éventuelle de bulles d'oxygène.

### 3) Croissance en anaérobiose

Des tubes de gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479) additionnée de pourpre de bromocrésol à 0,02 p. 100 (concentration finale) étaient maintenus à l'ébullition pendant 20 mn puis refroidis à 45° C. Après ensemencement, le contenu des tubes était transvasé dans des tubes stériles de 8 × 400 mm (Raibaud *et al.*, 1966) puis mis à l'étuve à 37° C. Après 24 et 48 h d'incubation on examinait la croissance des germes et le changement de coloration de l'indicateur.

### 4) Croissance à différentes températures

Le milieu de base (milieu de Lubert et Frazier modifié) était amené à la température voulue : 10° C ou 45° C ( $\pm 0,1^\circ$  C), puis ensemencé. Le développement bactérien était apprécié après 24 et 48 h pour les cultures incubées à 45° C et après une semaine pour les cultures incubées à 10° C, par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé incubé à la même température (appréciation de la turbidité et mesure du pH).

### 5) Croissance en présence de 0,05 p. 100 de tellurite de potassium

A 9 ml de milieu Tryptose Blood Agar Base Difco n° 232 était ajouté 1 ml d'une solution aqueuse à 0,5 p. 100 de tellurite de potassium B.D.H. filtrée sur Seitz. Le milieu était coulé en boîtes de Petri et, après refroidissement, il était ensemencé en surface avec la souche étudiée. Sur ce milieu, *Str. faecalis* et ses variétés donnent des colonies noires (réduction du tellurite de potassium) ; *Str. faecium* et *Str. durans* donnent des petites colonies grisâtres ou ne se développent pas, les autres streptocoques fécaux ne se développent pas sur ce milieu.

### 6) Croissance en présence de chlorure de triphényltétrazolium (T.T.C.)

Le milieu de Barnes (1956) a été utilisé. Sur ce milieu *Str. faecalis* et ses variétés donnent en 24 à 48 h d'étuve à 37° C des colonies à centre rouge entouré d'une auréole blanche ; *Str. faecium* et *Str. durans* donnent des colonies blanches ou faiblement rosées ; *Str. bovis* de très petites colonies rouge franc ou blanches, les streptocoques lactiques donnent de très petites colonies rouge foncé sans auréoles blanches. L'apparition d'une coloration rouge indique que le triphényltétrazolium est réduit en formazan.

### 7) Production d'acide à partir des glucides et alcools

Le milieu utilisé était celui décrit par Shaw *et al.* (1951). La concentration finale en glucide ou en alcool était de 0,5 p. 100. La production d'acide était décelée par le changement de coloration de l'indicateur (pourpre de bromocrésol à 0,02 p. 100 de concentration finale).

### 8) Production d'acétoïne

La recherche de l'acétoïne a été faite selon la méthode de Barritt (1936) dans des cultures en bouillon de Swartling (1951) contenant

soit du citrate de sodium, soit du lactose, soit du glucose, soit du pyruvate de sodium ou de l'acétate de sodium. La recherche de l'acétoïne a été faite également dans des cultures sur lait écrémé autoclavé pendant 20 mn à 118° C additionné ou non de citrate trisodique ou d'acétate de sodium.

#### 9) *Fermentation du citrate*

Gunsalus et Campbell (1944) ont montré que certaines souches de *Str. faecalis* sont susceptibles de fermenter l'acide citrique en l'absence de tout sucre fermentescible en produisant de l'acide acétique, du CO<sub>2</sub>, de l'acide formique et de l'acide lactique. Nous avons de notre côté recherché si les souches isolées produisaient du gaz à partir de différents substrats : citrate de sodium, pyruvate de sodium et acétate de sodium. Le milieu utilisé avait la composition suivante : bacto-tryptone 1 p. 100 ; phosphate bipotassique 0,2 p. 100 ; chlorure de sodium 0,5 p. 100 ; gélose 0,5 p. 100 et pourpre de bromocrésol 0,02 p. 100. Il était additionné soit de citrate trisodique, soit de pyruvate de sodium, soit d'acétate de sodium (0,5 p. 100). Le même milieu additionné soit de lactose (0,5 p. 100), soit de lait écrémé stérile (1 ml de lait pour 3 ml de milieu) a été également utilisé. Les milieux ensemencés étaient transvasés dans des tubes Veillon ; après refroidissement un bouchon de gélose à 15 p. 100 était coulé au-dessus des milieux ensemencés. Les cultures étaient mises à incuber à 37° C et examinées chaque jour pendant deux semaines.

#### 10) *Résistance à un chauffage de 60° C pendant 30 mn*

La méthode décrite par Abd-el-Malek et Gibson (1948) a été utilisée.

#### 11) *Résistance au chlorure de sodium*

Les souches étaient cultivées à 37° C pendant 72 h dans le milieu de base (milieu de Lubert et Frazier modifié) contenant 6,5 ; 7,5 ; 10 ou 15 p. 100 de ClNa (concentration finale).

#### 12) *Action sur le lait tournesolé*

Les souches étaient cultivées à 37° C et les changements apparus dans le lait tournesolé étaient notés après 24 - 48 h et 1 semaine d'incubation.

#### 13) *Hydrolyse de la gélatine*

Le milieu gélatiné utilisé était celui décrit par Baird-Parker (1963). La méthode de Frazier (1926) était employée pour déceler l'hydrolyse de la gélatine.

#### 14) *Caséolyse*

Les souches étaient cultivées sur gélose nutritive additionnée de lait écrémé stérile (concentration finale : 10 p. 100). Les colonies qui présentaient une auréole claire après addition de chlorure mercuri-

que acide (Frazier, 1926) étaient considérées comme caséolytiques. Le milieu au caséinate de sodium (Bacto Nutritive Caseinate Agar Difco n° 27) a été également utilisé.

#### 15) Lipolyse

La recherche de l'hydrolyse de la tributyrine a été faite selon la méthode conseillée par la « British Standards Institution » (1940).

#### 16) Hémolyse

Le milieu Tryptose Blood Agar Base Difco n° 232 additionné de 5 p. 100 de sang de mouton a été utilisé.

#### 17) Etude sérologique

L'étude sérologique des souches a été faite selon la technique de Lancefield. La production de substance antigénique par les entérocoques étant parfois faible, la technique de Shattock (1949) a été également utilisée pour certaines souches.

#### 18) Croissance sur milieu au jaune d'œuf

Le milieu E.T.G.P.A. décrit par Baird-Parker (1962) pour la recherche des staphylocoques coagulase-positifs a été utilisé. En effet nous avons fréquemment isolé des colonies d'entérocoques en utilisant ce milieu. Il nous a donc paru intéressant de voir si certains entérocoques ne donnaient pas des colonies susceptibles d'être confondues avec celles de *Staphylococcus aureus*.

## RESULTATS

### a) Evolution des entérocoques au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort

Le résultat du dénombrement des entérocoques et des germes totaux effectué sur le lait de fabrication avant l'emprésurage, sur le caillé à la mise en moules et sur le lactosérum est donné dans le

TABLEAU 1

Entérocoques et germes totaux du lait, du caillé et du lactosérum dans une fabrication traditionnelle de fromage de Roquefort

(Les chiffres donnés correspondent à la moyenne de 2 échantillons)

	Entérocoques (en millions)	Germes totaux (en millions)	Entérocoques
			$\frac{\text{Germes totaux}}{\text{Entérocoques}} \times 100$
Lait de mélange avant empré- surage (par ml) .....	4,0	260	1,5
Caillé à la mise en moules (par g) .....	120	2 000	6,0
Lactosérum (par ml) .....	0,70	22	3,1

tableau 1. Nous voyons que le rapport entérocoques/germes totaux ( $\times 100$ ) passe de 1,5 dans le lait de mélange à 6,0 dans le caillé à la mise en moules.

Le résultat du dénombrement des entérocoques et des germes totaux à la surface et au centre du fromage de Roquefort au cours des différents stades de la fabrication et de l'affinage est donné dans le tableau 2.

Pour les échantillons prélevés à la surface du fromage nous constatons une diminution continue du nombre des entérocoques depuis le passage en salle froide jusqu'à la commercialisation des fromages. Avant salage, nous avons un rapport entérocoques/germes totaux ( $\times 100$ ) de 2,2 alors que ce rapport est de 13,5 après salage ; ceci est dû à la très nette diminution du nombre des germes totaux, essentiellement des streptocoques lactiques, au cours du salage, tandis que le nombre des entérocoques diminue peu au cours de cette période. Au cours de l'affinage le nombre des entérocoques diminue tandis que celui des germes totaux augmente et, à partir du 35<sup>me</sup> jour après l'emprésurage, le rapport entérocoques/germes totaux ( $\times 100$ ) devient inférieur à 1.

Au centre du fromage nous constatons que le nombre des entérocoques diminue jusqu'au salage. Au cours du salage le nombre des entérocoques augmente légèrement, phénomène que nous avons constaté dans plusieurs autres fabrications de Roquefort traditionnelles. Au cours de l'affinage le nombre des entérocoques varie peu, il en est de même pour le nombre de germes totaux, aussi le rapport entérocoques/germes totaux ( $\times 100$ ) varie peu au cours de l'affinage, restant compris entre 6 et 8.

Le dénombrement des bactéries coliformes, des levures et des microcoques ont donné des résultats comparables à ceux obtenus antérieurement (Devoyod et al., 1966 et 1968) montrant ainsi que l'évolution de la flore microbienne des fromages dont nous avons suivi la fabrication et l'affinage était semblable à celle rencontrée dans d'autres fabrications de Roquefort traditionnelles.

#### **b) Caractères biochimiques des souches isolées**

Cent-huit souches ont été isolées sur milieu de Mossel. Elles présentaient toutes les caractères indiqués dans le tableau 3.

L'étude sérologique effectuée sur 24 souches a montré que toutes appartenaient au group D de Lancefield. Tous ces caractères montrent que toutes les souches isolées étaient bien des entérocoques.

Les colonies obtenues en présence de 0,05 p. 100 de tellurite de potassium étaient régulières, rondes, lisses et noires ; sur milieu de Barnes au chlorure de triphényltétrazolium (T.T.C.), les colonies étaient régulières, rondes, lisses, à centre rouge foncé entouré d'une auréole blanche. Aucune de ces souches n'hémolysait le sang de mouton. Ces caractères correspondent à l'espèce *Streptococcus faecalis* et à ses variétés.



TABLEAU 2

Entérocoques et germes totaux aux différents stades de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort

(Les résultats sont donnés en millions de germes par g de fromage)

Stade de fabrication	Surface du fromage			Centre du fromage		
	Entérocoques	Germes totaux	Entérocoques	Entérocoques	Germes totaux	Entérocoques
			× 100			× 100
			Germes totaux			
24 h après emprésurage ..	245	5 700	4,3	260	5 600	4,6
48 h après emprésurage ..	75	3 900	1,9	75	3 500	2,1
Fromages en salle froide ..	110	8 100	1,3	39	3 500	1,1
Avant salage .. . . . . .	80	3 600	2,2	38	3 400	1,1
Après salage .. . . . . .	35	260	13,5	59	690	8,5
25 j après emprésurage ..	18	750	2,4	39	595	6,5
35 j après emprésurage ..	5	1 350	0,37	44	800	5,5
70 j après emprésurage ..	6	915	0,65	56	660	8,5
100 j après emprésurage ..	4,5	1 100	0,41	27	320	8,4

TABLEAU 3

Caractères communs aux 108 souches isolées sur milieu de Mossel (1957)

Morphologie . . . . .	Coques associés par 2 ou 3 ou courtes chaînes
Catalase . . . . .	—
Anaérobiose . . . . .	Facultative
Croissance à 10° C . . . . .	+
Croissance à 45° C . . . . .	+
Croissance en présence de chlorure de triphé- nyltétrazolium . . . . .	+
Croissance en présence de 0,05 p. 100 de tellu- rite de potassium . . . . .	+
Croissance en présence de 6,5 p. 100 de ClNa . .	+
Production d'acide à partir de :	
Glucose . . . . .	+
Lactose . . . . .	+
Sorbitol . . . . .	+
Mannitol . . . . .	+
Tréhalose . . . . .	+
Raffinose . . . . .	—
Résistance à un chauffage dans le lait de 60° C pendant 30 mn . . . . .	+
Hydrolyse de la tributyrine . . . . .	—

Quatre-vingt-quinze souches hydrolysaient la gélatine et peptonisaient le lait tournesolé après coagulation ; elles peuvent être considérées comme appartenant à l'espèce *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Les treize autres souches qui n'hydrolysaient pas la gélatine et qui ne peptonisaient pas le lait tournesolé peuvent être considérées comme appartenant à l'espèce *Str. faecalis*.

Nous avons porté dans le tableau 4 les résultats concernant la résistance au chlorure de sodium des souches isolées. Toutes résistaient à 7,5 p. 100 de sel et aucune ne résistait à 15 p. 100. Soixante et une souches étaient capables de se développer en présence de

TABLEAU 4

Résistance au chlorure de sodium de 108 souches d'entérocoques isolées du fromage de Roquefort

Concentration en ClNa	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. faecalis</i>
7,5 p. 100	95/95	13/13
10 p. 100	55/95	6/13
15 p. 100	0/95	0/95



10 p. 100 de sel. Elles ont été isolées soit des échantillons prélevés à la surface du fromage après salage et au cours de l'affinage, soit des échantillons prélevés au centre du fromage au cours de l'affinage. Les quarante-sept souches d'entérocoques dont la croissance était inhibée par 10 p. 100 de ClNa ont été isolées soit du lait de mélange avant emprésurage, du caillé à la mise en moules et du lactosérum, soit des échantillons prélevés au centre du fromage au cours de l'affinage.

La production de gaz à partir du pyruvate de sodium par les souches d'entérocoques était très rapide et abondante (après 16 h à 37° C, le milieu gélosé dans les tubes Veillon était morcelé et les bouchons de gélose atteignaient le haut des tubes). La production de gaz à partir du citrate trisodique seul était plus rapide à pH 6 qu'à pH 7. Nous avons obtenu une production de gaz plus importante et plus rapide à partir du citrate en utilisant comme inoculum des bactéries repiquées 4 fois successivement sur bouillon au citrate (milieu de Swartling avec citrate). La production de gaz était toujours plus rapide pour les souches de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* que pour les souches de *Str. faecalis*. Lorsque le milieu au citrate était additionné de lactose ou de lait la production de gaz apparaissait en 3 à 5 jours au lieu de 7 dans le milieu au citrate seul.

En présence de citrate seul, on constatait tout d'abord une acidification du milieu, mise en évidence par le changement de coloration de l'indicateur, puis une décarboxylation du citrate comme l'indiquait la présence de gaz dans les tubes. Pour les souches de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, en présence de lait, l'acidification du milieu était suivie d'une peptonisation du milieu, indiquée par la présence de zones de liquéfaction, dans lesquelles apparaissaient les bulles de gaz. Aucune production de gaz n'a été décelée en présence d'acétate de sodium. Les souches d'entérocoques isolées du fromage de Roquefort semblent donc être du même type que la souche étudiée par Gunsalus et Campbell (1944).

Toutes les souches d'entérocoques isolées se développaient et formaient des colonies sur le milieu E.T.G.P.A. de Baird-Parker. Ces colonies étaient petites, noires et lisses. D'après les modifications observées sur ce milieu nous avons distingué 4 groupes parmi les souches d'entérocoques : celles qui n'apportaient aucune modification apparente au milieu, les souches qui en se développant donnaient une zone de précipitation autour des colonies, celles dont les colonies étaient entourées d'une zone de lyse claire et enfin les souches qui en se développant donnaient autour des colonies une zone de précipitation et une zone de lyse claire (tab. 5).

Sur milieu au caséinate de sodium et sur lait gélosé, toutes les colonies de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* étaient entourées d'une zone claire indiquant ainsi que ces souches étaient caséolytiques. Parmi les souches de *Str. faecalis*, 7 donnaient des zones de lyse sur

ces milieux, mais ces zones étaient toujours plus petites que celles obtenues avec les souches de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Les 6 autres souches de *Str. faecalis* ne donnaient pas de zone de lyse.

TABLEAU 5

Modification du milieu E.T.G.P.A. de Baird-Parker (1962) par les 108 souches d'entérocoques isolées du fromage de Roquefort

Action sur le milieu	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	<i>Str. faecalis</i>
Pas de zone . . . . .	4	9
Zone de précipitation . . . . .	3	2
Zone de lyse . . . . .	4	2
Zone de précipitation + zone de lyse . . . . .	83	0
<i>Total</i> . . . . .	94	13

## DISCUSSION

### a) Evolution des entérocoques au cours de la fabrication et de l'affinage

#### 1) A la surface du fromage

Nous avons vu que la majeure partie des souches d'entérocoques isolées à partir des échantillons prélevés au cours des premiers stades de la fabrication ne se développait pas dans un milieu contenant 10 p. 100 de chlorure de sodium. Par contre les souches que nous avons isolées après le salage en surface, étaient capables de se développer en présence d'une telle concentration de ClNa. Le salage des fromages provoque donc, à la surface du fromage, à la fois une légère diminution du nombre des entérocoques et aussi une sélection parmi ces entérocoques. L'action inhibitrice du sel est cependant, comme on pouvait s'y attendre, nettement plus marquée vis-à-vis des micro-organismes de la flore totale, constituée essentiellement de streptocoques lactiques (Devoyod *et al.*, 1968), que vis-à-vis des entérocoques. Au cours de l'affinage, nous avons constaté que le nombre des germes totaux augmentait alors que celui des entérocoques continuait à diminuer. Cela peut s'expliquer par le fait qu'après le salage la flore totale est constituée principalement de levures et de microcoques qui se multiplient (Devoyod *et al.*, 1966 et 1968).

## 2) Au centre du fromage

L'augmentation du nombre des entérocoques, que nous avons constatée au cours du salage, peut s'expliquer ainsi : lors du salage des fromages, la concentration en chlorure de sodium augmente progressivement au centre, et non pas brutalement comme à la surface ; de ce fait les entérocoques se trouvent dans un milieu où ils peuvent encore se développer, mais ce milieu est suffisamment salé (5,5 à 6 g de ClNa p. 100 de la phase aqueuse) pour provoquer une diminution du nombre des streptocoques lactiques. De plus, il semblerait que l'ensemencement en micro-organismes halophiles par le sel soit lui aussi progressif (Devoyod, 1969) et les entérocoques ne se trouvent donc pas, comme en surface, en concurrence avec les microcoques et les levures.

L'arrêt du développement des entérocoques au cours de l'affinage ne semble pas dû au développement de *Penicillium roqueforti*, car nous avons constaté une évolution identique des entérocoques lors d'une fabrication dans laquelle la croissance de *P. roqueforti* était inhibée par un fungistatique (thiabendazole).

## b) Caractères biochimiques des souches isolées

Parmi les entérocoques isolés, nous avons trouvé qu'une partie importante (88 p. 100) appartenait à l'espèce *Str. faecalis* var. *liquefaciens*. Il semble que la prédominance de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* par rapport à *Str. faecalis* soit en relation avec la qualité du fromage. En effet, dans d'autres fabrications où les fromages étaient de moins bonne qualité, nous avons trouvé plus de *Str. faecalis* que de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*.

L'étude de la résistance au chlorure de sodium des souches isolées aux différents stades de la fabrication et de l'affinage a montré qu'une sélection des entérocoques s'était produite au cours du salage. Cependant nous n'avons pas pu rattacher la propriété qu'avaient certaines souches de se développer en présence de 10 p. 100 de chlorure de sodium à aucun autre caractère biochimique étudié.

Nous avons indiqué que les souches d'entérocoques et plus particulièrement celles de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, étaient capables de fermenter le citrate, caractère qu'Abd-el-Malek et Gibson (1948) considéraient comme très important, bien que non spécifique, du groupe des entérocoques. Gunsalus et Campbell (1944) ont montré que la production de gaz et d'acétoïne par certaines souches de *Str. faecalis* à partir du citrate se faisait selon le schéma suivant :

- acide citrique → acide acétique + (acide oxalacétique) (1)  
 (acide oxalacétique) → CO<sub>2</sub> + acide pyruvique (2)  
 1 acide pyruvique → acide acétique + acide formique (3a)  
 2 acide pyruvique → CO<sub>2</sub> + acide acétique + acide lactique (3b)  
 2 acide pyruvique → 2 CO<sub>2</sub> + acétylméthylcarbinol (3c).

La réaction 3a n'est possible qu'en milieu alcalin tandis que les réactions 3b et 3c se produisent à pH acide (5,0 - 6,0) c'est-à-dire dans une zone de pH comparable à celle que l'on trouve au centre du fromage. Il n'est donc pas interdit de penser que la forte teneur en CO<sub>2</sub> trouvée au centre du fromage (Bret, 1965), soit due, au moins en partie, à l'action des entérocoques.

Quel est le rôle des entérocoques dans le fromage de Roquefort ? Il faut remarquer que l'on rencontre ces micro-organismes en quantité non négligeable à tous les stades de la fabrication et l'affinage. Il semblerait d'autre part que le caractère caséolytique de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* soit important. Nous avons montré en effet (Devoyod et Muller, 1969) que les souches de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, de même que les filtrats de culture sur lait de ces souches, stimulaient la production d'acide de certains streptocoques lactiques et favorisaient le développement et la production de gaz des *Leuconostoc*. Il est donc possible que les entérocoques jouent ainsi un rôle dans la « maturation » du lait de brebis, permettant un meilleur développement de la flore lactique homo- et hétérofermentaire. Nous avons constaté, par exemple, que dans le cas de bonnes fabrications, c'est-à-dire lorsque l'acidification et l'ouverture étaient correctes, *Str. faecalis* var. *liquefaciens* représentait la majeure partie des entérocoques. Enfin, il semblerait que *Str. faecalis* var. *liquefaciens* ait une action sur la texture du caillé : en effet, en présence de ces germes, la pâte a tendance à être plus « longue », moins cassante.

L'étude de la croissance des entérocoques sur milieu E.T.G.P.A. a montré enfin que certaines souches étaient susceptibles de donner des colonies d'aspect identique à celles de *Staphylococcus aureus* ; toutefois aucune colonie d'entérocoques ne présentait la bordure claire caractéristique des staphylocoques (Baird-Parker, 1962).

### Références bibliographiques

- [1] ABD-EL-MALEK (Y.) et GIBSON (T.) (1948). — Studies in the bacteriology of milk. I. The streptococci of milk. *J. Dairy Res.*, 15, 233.
- [2] BAIRD-PARKER (A. C.) (1962). — An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. *J. appl. Bact.*, 25, 12.
- [3] BAIRD-PARKER (A. C.) (1963). — A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. Gen. Microbiol.*, 30, 409.
- [4] BARNES (E.M.) (1956). — Methods for the isolation of faecal streptococci (Lancefield group D) from bacon factories. *J. appl. Bact.*, 19, 193.
- [5] BARRITT (M. M.) (1936). — The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of  $\alpha$ -naphthol. *J. Path. Bact.*, 42, 441.
- [6] BRITISH STANDARDS INSTITUTION. — *Stand Specif.*, 1940, n° 895. Methods for the microbiological examination of butter.
- [7] BRET (G.). — *Communication personnelle*, 1965.
- [8] DEVOYOD (J. J.) (1969). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. II. Staphylocoques et microcoques. *Le Lait*, 481-482, 1.

- [9] DEVOYOD (J. J.) et BRET (G.) (1966). — Evolution de la flore microbienne au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort. *XVII<sup>e</sup> Cong. Lait. Int. de Laiterie*, D-2, 585.
- [10] DEVOYOD (J. J.), BRET (G.) et AUCLAIR (J. E.) (1968). — Flore microbienne du fromage de Roquefort. I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage. *Le Lait*, 479-480, 613.
- [11] DEVOYOD (J. J.) et MULLER (M.) (1969). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. III. Les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc*. Influence de différents micro-organismes de contamination. *Le Lait*, 487, 369.
- [12] FRAZIER (W. C.) (1926). — A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. inf. Dis.*, 39, 302.
- [13] GUNSALLUS (I. C.) et CAMPBELL (J. J. R.) (1944). — Diversion of the lactic acid fermentation with oxidized substrate. *J. Bact.*, 48, 455.
- [14] LUBERT (D. J.) et FRAZIER (W. C.) (1955). — Microbiology of the surface ripening of brick cheese. *J. Dairy Sci.*, 38, 982.
- [15] MOCQUOT (G.) et BEJAMBES (M.) (1960). — Technology of ewes' milk and goats' milk products. I. Ewes' milk products. *Dairy Sci. Abst.*, 22, 1.
- [16] MOSSEL (D. A. A.), VAN DIEPEN (H. M. J.) et DE BRUIN (A. S.) (1957). — The enumeration of faecal streptococci in foods using Packer's crystal violet sodium azide blood agar. *J. appl. Bact.*, 20, 265.
- [17] PACKER (R. A.) (1943). — The use of sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) and crystal violet in a selective medium for streptococci and *Erysipelthrix rhusiopathiae*. *J. Bact.*, 46, 343.
- [18] RAIBAUD (P.), DICKINSON (A. B.), CHARLIER (H.) et MOCQUOT (G.) (1966). — La microflore du tube digestif du rat. I. Techniques d'étude et milieux proposés. *Ann. Inst. Pasteur*, 110, 568.
- [19] SHATTOCK (P. M. F.) (1949). — The streptococci of groupe D ; the serological grouping of *Str. bovis* and observations on serological refractory group D Strains. *J. Gen. Microbiol.*, 3, 80.
- [20] SHAW (C.), STITT (J. M.) et COWAN (S. T.) (1959). — Staphylococci and their classification. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 1010.
- [21] SWARTLING (Per. F.) (1951). — Biochemical and serological properties of some citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 18, 256.

### Remerciements

Nous remercions vivement M. Bret, Directeur du Laboratoire de la Société des Caves de Roquefort pour la collaboration qu'il nous a apportée dans la réalisation de notre étude. Nos remerciements vont également à MM. Auclair et Raibaud pour leurs suggestions et leurs critiques qui ont été pour nous une aide précieuse dans la présentation de ce travail.

### Résumé

L'évolution des entérocoques au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage de Roquefort a été étudiée. Cent-huit souches d'entérocoques ont été isolées et identifiées ; 95 appartenaient à l'espèce *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* et 13 à l'espèce *Str. faecalis*. Les souches de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* étaient capables de fermenter le citrate de sodium en l'absence de sucre. Le rôle possible des entérocoques au cours de la fabrication du fromage est discuté.

*The microbial flora of Roquefort cheese*

*IV - The enterococci*

**Summary**

The development of enterococci was studied during the making and the ripening of Roquefort cheese. 108 strains of enterococci were isolated and identified ; 95 belonged to the species *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* and 13 to the species *Str. faecalis*. The strains of *Str. faecalis* var. *liquefaciens* were able to ferment sodium citrate in the absence of sugar. The possible role played by enterococci in Roquefort cheese is discussed.

*Reçu pour publication en juillet 1969.*

---