La flore microbienne du fromage de Roquefort

III. Les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc*

Influence de différents micro-organismes de contamination

par

J. J. DEVOYOD et M. MULLER

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

(avec la collaboration technique de M.-J. LAPIERRE et D. SPONEM)

INTRODUCTION

En examinant des échantillons de fromage de Roquefort prélevés au cours de la fabrication et de l'affinage (Devoyod et Bret, 1966) nous avons constaté, en dénombrant la flore totale sur gélose nutritive additionnée d'un indicateur de pH, la présence de colonies lenticulaires, acidifiantes, qui ressemblaient à des colonies de streptocoques lactiques. Une étude sommaire nous a montré que ces micro-organismes acidifiants appartenaient aux genres *Streptococcus* et *Leuconostoc*.

Or, selon Babel (1953), dans le fromage bleu, les streptocoques producteurs d'acide disparaissent après le salage et dans les 10 jours qui suivent. Le fait que l'on trouve en flore dominante, au centre du fromage de Roquefort en fin d'affinage, des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc* qui ont non seulement survécu en présence de fortes teneurs en chlorure de sodium, mais se sont multipliés, permet de penser que ces germes possèdent des caractères particuliers. Il nous a donc paru intéressant de prélever aux différents stades de la fabrication et de l'affinage les micro-organismes acidifiants et d'étudier leurs principaux caractères biochimiques.

Comme nous le verrons plus loin, les streptocoques isolés du caillé et du fromage de Roquefort produisent peu d'acide ou en produisent très lentement ; or, ces mêmes germes, dans le caillé, acidifient normalement. Les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc* trouvent donc dans le fromage de Roquefort des conditions

favorables. Le lait de brebis utilisé dans les fabrications traditionnelles contient de nombreux micro-organismes de contamination. On peut penser que certains de ces germes ont une action stimulante vis-à-vis des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc*. Plusieurs auteurs ont montré en effet que la production d'acide des bactéries lactiques augmentait lorsqu'on les cultivait dans un lait où s'étaient développés certains micro-organismes tels que *Bacillus subtilis* (Rice, 1949), *Escherichia coli* (Hall, 1956), *Pseudomonas fluorescens* (Claydon et Koburger, 1961). C'est la raison pour laquelle, au cours de cette étude, qui, précisons-le, a été faite sur des fabrications traditionnelles en l'absence de toute addition de levains commerciaux, nous avons recherché quels étaient les micro-organismes de contamination présents dans le lait de brebis et dans le fromage de Roquefort, susceptibles d'avoir une action stimulante vis-à-vis des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc*.

MATERIEL ET METHODES

a) Isolement des micro-organismes acidifiants

L'isolement des micro-organismes acidifiants dans les échantillons de caillé et de fromage a été effectué en utilisant d'une part une gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479) additionnée de lait écrémé stérile et de pourpre de bromocrésol à 0,02 p. 100 (concentration finale), d'autre part une gélose au caséinate de sodium (Bacto Nutritive Caseinate Agar Difco n° 27). Le milieu de Turner *et al.* (1962) qui permet de différencier les souches de *Streptococcus lactis* de celles de *Streptococcus cremoris* a également été utilisé. Les *Leuconostoc* ont été isolés aussi sur le milieu sélectif de Mayeux *et al.* (1962), modification du milieu de Mayeux et Colmer (1961).

Pour chaque échantillon 5 à 10 colonies ont été repiquées, à partir de chacun des milieux, sur bouillon glucosé tamponné BS 4 (Sevel et Plommet, 1960). Après purification, les souches étaient conservées à + 4° C sur gélose inclinée.

b) Identification des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc*

Cette identification a été faite en deux étapes. Nous avons tout d'abord étudié la morphologie des souches isolées, leur production de catalase et leur faculté de produire du gaz à partir du glucose. Ces essais ont été effectués pour chaque souche aux deux températures d'incubation de 22° C et de 30° C. Les caractères ainsi étudiés nous ont permis de séparer les streptocoques des *Leuconostoc*. Nous avons ensuite étudié un certain nombre de caractères plus précis d'identification qui sont indiqués plus loin. Pour ces essais, l'inoculum était constitué par 1 p. 100 d'une culture de 16 heures de la souche à étudier sur bouillon tamponné BS 4. Les températures

d'incubation étaient de 30° C pour les streptocoques et de 22° C pour les *Leuconostoc*.

Les caractères suivants d'identification ont été étudiés :

1) MORPHOLOGIE

L'examen microscopique était effectué, après coloration au bleu de méthylène (solution alcoolique à 0,6 p. 100), sur une culture de 16 heures.

2) PRODUCTION DE CATALASE

Une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes était déposée sur une colonie développée pendant 48 heures sur gélose nutritive, afin d'observer la formation éventuelle de bulles d'oxygène.

3) PRODUCTION DE PSEUDO-CATALASE (*Leuconostoc* seulement)

Une technique identique à celle utilisée pour la recherche de la catalase a été employée sur des colonies développées sur gélose au sang chauffé (HB agar : Whittenbury, 1964).

4) PRODUCTION D'EAU OXYGÉNÉE (*Leuconostoc* seulement)

Le milieu au bioxyde de manganèse (MDO agar), décrit par Whittenbury (1964), a été utilisé.

5) 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 25 minutes puis refroidis à 47° C. Après ensemencement, le contenu des tubes était transvasé dans des tubes stériles de 70 × 420 mm (Raibaud *et al.*, 1966), puis mis à l'étuve. Après 24 et 48 heures d'incubation, on examinait la croissance du germe et le changement de coloration de l'indicateur.

6) CROISSANCE A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES

Le milieu BS 4 a été utilisé pour toutes les souches étudiées. De plus, le bouillon MRS (de Man *et al.*, 1960) a été utilisé dans le cas des *Leuconostoc*. Ces milieux étaient amenés à la température voulue : 10° C, 40° C et 45° C ($\pm 0,1^\circ$ C), puis ensemencés. Le développement des souches était apprécié après une semaine d'incubation pour les cultures à 10° C et après 24 et 48 heures pour les cultures à 40° C et 45° C, par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé incubé à la même température (examen de la turbidité et mesure du pH).

7) PRODUCTION DE CO₂ A PARTIR DU GLUCOSE

Nous avons utilisé le milieu de Mc Cleskey *et al.* (1947), modifié par Fournaud (1967), de composition suivante : tryptone 1 p. 100, extrait de levure 0,5 p. 100, phosphate bipotassique 0,1 p. 100, glucose 5 p. 100 et gélose 0,5 p. 100. Après ensemencement, le milieu était transvasé dans des tubes Veillon et, après refroidissement, un bouchon de gélose double était coulé dans les tubes. Les tubes étaient examinés

chaque jour pendant deux semaines. Des concentrations plus faibles de glucose (1 et 2 p. 100) ont été également employées.

8) PRODUCTION DE DEXTRANE (*Leuconostoc* seulement)

Le milieu de Mc Cleskey *et al.* (1947) contenant 15 p. 100 de saccharose a été utilisé. Les souches étaient incubées pendant une semaine à la température du laboratoire (22 à 25° C). L'augmentation de la viscosité du milieu était appréciée par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé.

9) PRODUCTION D'ACÉTOÏNE

Après une incubation de 48 heures et d'une semaine, sur milieu de Swartling (1951) et sur bouillon BS 4, la recherche de l'acétoïne était faite selon la méthode de Barritt (1936).

10) DÉSAMINATION DE L'ARGININE

Le milieu BS 4 additionné de L-monochlorhydrate d'arginine (concentration finale 0,3 p. 100) et le milieu de Niven *et al.* (1942) ont été utilisés. Après 48 heures et une semaine d'incubation, la présence d'ammoniaque dans les cultures était décelée en ajoutant, sur une plaque à touches, une goutte de réactif de Nessler à une goutte de culture. La lecture des résultats se faisait immédiatement après addition du réactif.

11) RÉDUCTION DES NITRATES

Le milieu BS 4 additionné de 0,1 p. 100 de nitrate de potassium (concentration finale) a été utilisé. Après 48 heures et une semaine d'incubation, la présence éventuelle de nitrite était recherchée à l'aide du réactif de Griess-Ilosvay.

12) RÉSISTANCE A UN CHAUFFAGE DE 60° C PENDANT 30 MINUTES

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

13) RÉSISTANCE AU CHLORURE DE SODIUM

Les souches étaient cultivées pendant 72 heures dans le milieu BS 4 contenant 2 - 4 - 6,5 et 7,5 p. 100 de ClNa (concentration finale). Le développement des cultures était apprécié par comparaison avec un tube témoin non ensemencé incubé à la même température (examen de la turbidité et mesure du pH).

14) ACTION SUR LE LAIT TOURNESOLÉ (lait de vache et lait de brebis)

Les changements apparus dans le lait tournesolé (réduction, acidification, coagulation, présence de sérum, digestion) étaient notés après 24, 48 et 72 heures, une semaine et 15 jours d'incubation.

15) MESURE DE L'ACTIVITÉ ACIDIFIANTE (streptocoques lactiques seulement)

Le milieu utilisé était de la poudre de lait écrémé Spray, instantanément soluble, exempte d'antibiotiques. 100 g de poudre étaient ajoutés à 1 000 ml d'eau distillée. On répartissait à raison de 50 ml

dans des fioles à vis de 125 ml. Les fioles étaient placées pendant 30 minutes dans un bain-marie réglé à $80^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Après refroidissement, les fioles étaient conservées à $+4^{\circ}\text{C}$. Elles étaient utilisées dans les 5 jours qui suivaient la préparation.

Les souches étaient entretenues sur lait tournesolé autoclavé, par repiquage à 1 p. 100 et incubation pendant 18 à 20 heures à 22°C .

Les fioles de lait étaient réchauffées au bain-marie à 30°C avant l'ensemencement. Chaque culture était diluée au 1/4 dans une solution de Ringer au 1/4 stérile ; 2 ml de cette dilution étaient ajoutés à la fiole contenant 50 ml de lait (ensemencement final 1 p. 100). Deux séries de fioles étaient incubées dans un bain-marie réglé à $30^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, l'une pendant 6 heures exactement, l'autre pendant 24 heures. Au bout de ces temps, on pesait 9 g de culture. On ajoutait 0,5 ml d'une solution de phénolphthaléine à 1 p. 100 dans l'alcool éthylique à 95°G.L. On titrait avec de la soude N/10 jusqu'à virage au rose pâle. Les résultats étaient exprimés en degré Dornic. Si l'acidité ne pouvait être mesurée immédiatement à la fin des temps d'incubation, on refroidissait chaque fiole à environ 0°C .

La mesure de l'activité acidifiante a été également faite en utilisant du lait de brebis de grand mélange.

16) CASÉOLYSE

Les souches étaient cultivées d'une part sur gélose nutritive additionnée de lait écrémé stérile (concentration finale 10 p. 100) et d'autre part sur gélose au caséinate de sodium (Bacto Nutritive Caseinate Agar Difco n° 27). Les colonies qui présentaient une auréole claire après addition de chlorure mercurique acide (Frazier, 1926) étaient considérés comme caséolytiques.

17) LIPOLYSE

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

18) HYDROLYSE DE L'ESCULINE (*Leuconostoc* seulement)

Les souches étaient cultivées pendant une semaine sur un milieu de composition suivante : tryptone 1 p. 100, lab-lemco 0,3 p. 100, extrait de levure 0,1 p. 100, phosphate disodique 0,5 p. 100, esculine 0,5 p. 100, solution de citrate ferrique ammoniacal 0,05 p. 100 (v/v). Le noircissement du milieu ou la perte de fluorescence indiquait une hydrolyse de l'esculine (apparition d'aglicone phénolique).

19) PRODUCTION D'ACIDE A PARTIR DES GLUCIDES ET ALCOOLS

Le milieu utilisé était celui de Shaw *et al.* (1959). La concentration finale en glucides et alcools était de 0,5 g pour 100 ml de milieu. Les glucides et alcools suivants ont été essayés : amidon, L (+) et D (—) arabinose, glucose, lactose, maltose, mannitol, raffinose, saccharose, salicine et tréhalose. Pour les streptocoques lacti-

ques nous avons essayé de plus sorbitol et sorbose et pour les *Leuconostoc* cellobiose, mélézitose, mélibiose et xylose.

20) ETUDE SÉROLOGIQUE (streptocoques seulement)

L'étude sérologique des souches a été faite selon la technique de Lancefield. La technique de Shattock (1949) a été également utilisée pour confirmer les résultats lorsque les zones de précipitation étaient faiblement distinctes.

21) PRODUCTION DE GAZ A PARTIR DU CITRATE, DU PYRUVATE, DU MALATE ET DU LACTATE (*Leuconostoc* seulement)

La production de gaz par les *Leuconostoc* à partir de ces différents substrats a été recherchée en présence et en l'absence de sucre fermentescible. Les *Leuconostoc* produisant du CO₂ à partir du glucose, différents autres sucres ont été essayés : lactose, saccharose, tréhalose, xylose et arabinose. La composition du milieu de base était la suivante : tryptone 1 p. 100, extrait de levure 0,5 p. 100, phosphate bipotassique 0,1 p. 100 et gélose 0,5 p. 100. Les sucres étaient ajoutés en solution aqueuse filtrée stérilement sur filtre Seitz (concentration finale 0,5 p. 100). Les solutions des différents substrats étaient également filtrées sur Seitz ; les concentrations utilisées étaient les suivantes : citrate 1,5 p. 100, pyruvate 1 p. 100, malate 1 p. 100 et lactate 0,5 p. 100 (concentration finale). Les milieux étaient fondus et amenés à 47° C, ensemencés, puis transvasés dans des tubes Veillon ; après refroidissement, un bouchon de gélose double était coulé dans les tubes. Les tubes étaient examinés chaque jour pendant deux semaines.

TABLEAU 1

Micro-organismes isolés du fromage de Roquefort utilisés au cours de cette étude

	Micro-organismes	Nombre de souches
Micro-organismes de contamination	<i>Saccharomyces</i> sp.	2
	<i>Saccharomyces lactis</i>	2
	<i>Rhodotorula</i> sp.	2
	<i>Hansenula</i> sp.	1
	<i>Pichia</i> sp.	1
	<i>Str. faecalis</i>	2
	<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	2
Streptocoques lactiques	<i>Str. lactis</i>	5
	<i>Str. cremoris</i>	5
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i>	2
	<i>L. lactis</i>	2
	<i>L. dextranicum</i>	1

22) CONFIGURATION DE L'ACIDE LACTIQUE PRODUIT (*Leuconostoc* seulement)

La méthode d'Orla-Jensen (1904) a été utilisée. Les souches étaient cultivées sur bouillon MRS. Après une incubation d'une semaine, l'acide lactique était extrait sous forme de lactate de zinc. Le pouvoir rotatoire et la teneur en eau du lactate de zinc formé étaient déterminés.

c) Influence de différents micro-organismes de contamination sur les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc*

Notre étude a porté essentiellement sur le rôle possible de deux types de micro-organismes de contamination : les levures et les entérocoques, que l'on trouve en quantité importante dans le fromage de Roquefort.

1) ORGANISMES

Dans le tableau 1 nous avons porté la liste des micro-organismes utilisés au cours de cette étude.

2) MÉTHODES

Nous avons recherché si les micro-organismes de contamination avaient une action, et plus particulièrement une action stimulante, sur la croissance et l'activité des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc*. Pour cela nous avons d'une part cultivé ces germes ensemble (cultures associées) et d'autre part nous avons étudié l'action de filtrats de culture sur lait et sur lactosérum de ces germes sur les différentes souches de streptocoques lactiques et de *Leuconostoc*.

3) TECHNIQUES

a) Mesure de la croissance

— Dénombrement sur milieu gélosé

Dans le cas des cultures associées, la croissance des deux organismes était mesurée, à intervalles réguliers, par dénombrement sur milieu gélosé. Nous avons utilisé d'une part une gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479) additionnée de pourpre de bromocrésol et d'autre part divers milieux sélectifs : pour les levures, Potato Dextrose Agar Difco n° 13 ajusté à pH 3,5 avec de l'acide tartrique ; pour les streptocoques lactiques, le milieu de Turner *et al.* (1962) ; pour les *Leuconostoc*, le milieu de Mayeux *et al.* (1962) et pour les entérocoques, le milieu de Mossel *et al.* (1957).

— Technique de Vanderzant (1968)

Cette technique, qui est une modification de celle décrite par Rosebury *et al.* (1954), permet de déterminer, sur milieu gélosé, les phénomènes d'interaction entre deux espèces bactériennes. Dans cette technique, les espèces bactériennes se trouvent à différentes concentrations, dans les rapports de 1/1 à 1/1 000. Il est ainsi pos-

sible de mettre en évidence des phénomènes de stimulation ou d'inhibition qui n'apparaîtraient peut-être pas en utilisant la technique classique du « cross-streaking » où les deux espèces se trouvent en proportion bien déterminée.

Les essais ont été effectués sur gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479) additionnée ou non de pourpre de bromocrésol et sur gélose au caséinate de sodium (Bacto Nutritive Caseinate Agar Difco n° 27).

— Néphélométrie

Cette technique a été employée pour rechercher l'action d'un filtrat de culture d'un organisme stimulant vis-à-vis des souches de streptocoques lactiques et de *Leuconostoc*. La croissance de ces souches était étudiée à l'aide d'un biophotomètre enregistreur Bonnet-Maury et Jouan. La mesure de la croissance par néphélométrie nécessitant l'emploi de milieux de culture transparents, nous avons utilisé un lactosérum obtenu par action de la présure sur du lait reconstitué (100 g de lait en poudre Spray pour 1 000 ml d'eau désionisée). Le lactosérum était ensuite filtré sur Seitz.

— Méthode des disques de papier sur gélose

Dix ml de gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479) additionnée de pourpre de bromocrésol (concentration finale 0,02 p 100) étaient, après fusion et refroidissement à 47° C,ensemencés avec 1 ml d'une dilution au 1/1 000 (dans du Ringer dilué au 1/4) d'une culture fraîche de la souche de streptocoque lactique ou de *Leuconostoc* (culture de 16 heures). La gélose ainsiensemencée était ensuite répartie dans une boîte de Petri. Des disques de 9 mm de diamètre de papier filtre Durieux n° 268, préalablement stérilisés à l'autoclave, étaient imbibés des différents filtrats de culture des micro-organismes stimulants. Les boîtes de Petri étaient mises à l'étuve à 30° C dans le cas des streptocoques lactiques et à 22° C dans le cas des *Leuconostoc*. Elles étaient examinées à intervalles réguliers pour apprécier le changement de coloration de l'indicateur et la croissance bactérienne autour des disques.

b) Production d'acide

La technique utilisée pour mesurer l'activité acidifiante est celle décrite à l'alinéa 15 du paragraphe c) Identification.

c) Production de gaz

La méthode décrite par Holmes *et al.* (1968) a été utilisée. Cette méthode consiste à cultiver les micro-organismes dans une fiole jaugée de 100 ml, graduée de 100 à 110 ml. 100 ml de milieu de cultureensemencé sont versés dans la fiole et un bouchon de Vaspar est coulé dans la fiole. Le mélange Vaspar est constitué de 50 g de vaseline, de 2 g de gélose, de 1 ml de Tween 80 et de 50 ml d'eau distillée. Lors de l'incubation, s'il y a production de gaz, le bouchon est soulevé et l'on peut mesurer la quantité de gaz produite dans la partie graduée du col de la fiole.

RESULTATS

a) Streptocoques lactiques

Cent-quatre souches de streptocoques acidifiants ont été isolées du caillé et du fromage de Roquefort. Parmi ces souches, 10, isolées à la surface du fromage après le salage ont été identifiées comme étant des entérocoques (croissance à 45° C et en présence de 6,5 p. 100 de ClNa) ; leur étude a fait l'objet d'un autre article (Devoyod, 1969). Sur les 94 souches restantes, 24 ont été isolées avant le salage et 70 après le salage et au cours de l'affinage. Pour les souches isolées après le salage, la moitié provenait d'échantillons prélevés à la surface du fromage, l'autre moitié provenait d'échantillons prélevés au centre. A l'examen microscopique, toutes ces souches apparaissaient sous forme de diplocoques isolés ou en courtes chaînes. Elles étaient anaérobies facultatives. Elles se développaient en présence de 2 p. 100 de ClNa mais non en présence de 6,5 p. 100. Elles réduisaient, acidifiaient et coagulaient le lait tournesolé. Ces micro-organismes se développaient à 10° C mais non à 45° C. Ils produisaient de l'acide à partir du glucose, du lactose, du mannitol, du saccharose et du tréhalose mais non à partir du raffinose, de la salicine, du sorbitol et du sorbose. Ils ne produisaient pas de gaz à partir du glucose. Quarante-huit souches essayées sur les 94 appartenaient toutes au groupe sérologique N de Lancefield. Nous voyons que tous ces micro-organismes correspondent à la description des streptocoques lactiques.

Soixante et onze souches (soit 76 p. 100) produisaient de l'ammoniaque à partir de l'arginine, se développaient à 40° C et en présence de 4 p. 100 de ClNa, produisaient de l'acide à partir du maltose et ne produisaient pas d'acétoïne à partir du citrate. Ces micro-organismes peuvent, par conséquent, être considérés comme appartenant à l'espèce *Str. lactis*. Nous avons constaté que toutes ces souches étaient capables de produire de l'acide à partir de l'amidon.

Vingt-trois souches (soit 24 p. 100) ne produisaient pas d'ammoniaque à partir de l'arginine, ne se développaient pas à 40° C ni en présence de 4 p. 100 de ClNa et ne produisaient pas d'acide à partir du maltose. Ces micro-organismes peuvent donc être considérés comme appartenant à l'espèce *Str. cremoris*.

Dans le tableau 2, nous avons porté les activités acidifiantes des streptocoques lactiques isolés du fromage de Roquefort. Nous constatons qu'en culture pure, ces micro-organismes sont en général peu acidifiants. Les souches qui ont une activité de 18 à 20° D coagulent le lait tournesolé très lentement, après plus de 72 heures d'incubation. Les souches d'activité moyenne (30 à 35° D) disparaissent en surface après le salage et au centre au cours de l'affinage.

TABLEAU 2

Activité acidifiante des streptocoques lactiques isolés du fromage de Roquefort

Activité acidifiante (acidité après 6 heures d'incubation à 30° C)	Prélèvement			
	Avant salage	10 jours après salage		Au cours de l'affinage
		surface	centre	
18 à 20° D	14 / 24	15 / 15	15 / 20	35 / 35
30 à 35° D	10 / 24		5 / 20	

$$\text{fraction} = \frac{\text{nombre de souches d'activité donnée}}{\text{nombre de souches isolées}}$$

Ces souches coagulent le lait tournesolé en 24 heures ; les acidités mesurées après 24 heures d'incubation à 30° C oscillent entre 75 et 85° D.

b) *Leuconostoc*

De nombreux auteurs ont étudié les *Leuconostoc* et ont proposé divers schémas d'identification (Hucker et Pederson, 1930, 1931 ; Abd-el-Malek et Gibson, 1948 ; Garvie, 1960 et Whittenbury, 1966). Au cours de cette étude, nous avons utilisé la classification de Garvie (1967 a et b) ; cet auteur a divisé les *Leuconostoc* en 6 espèces : *L. mesenteroides*, *L. dextranicum*, *L. paramesenteroides*, *L. lactis*, *L. cremoris* et *L. oenos*.

Parmi les 49 souches de streptocoques hétéro-fermentaires isolées du fromage de Roquefort, 19 ont été isolées avant le salage et 30 au cours de l'affinage. Toutes ces souches étaient anaérobies facultatives. Elles produisaient toutes du gaz à partir du glucose. Si la majeure partie de ces souches donnaient un résultat positif pour les trois concentrations de glucose essayées (1-2 et 5 p. 100), quelques souches (9/49 soit 18 p. 100) ne produisaient du gaz qu'en présence, soit de 5 p. 100, soit de 1 et 2 p. 100 de glucose. A l'examen microscopique, ces germes apparaissaient sous forme de coques groupés par deux ou en courtes chaînes.

Les caractères biochimiques des souches de *Leuconostoc* sont donnés dans le tableau 3. D'après la production de dextrane à partir du saccharose, la production d'acide à partir des pentoses et la production d'acétoïne en milieu citraté, nous avons pu distinguer 4 groupes parmi les *Leuconostoc* isolés du fromage de Roquefort. Ces groupes correspondent aux descriptions de *L. dextranicum*, *L. mesenteroides*, *L. paramesenteroides* et *L. lactis* données par Garvie.

Pour certaines souches de *L. mesenteroides*, la viscosité des cultures sur milieu de Mc Cleskey montrait un maximum au bout

TABLEAU 3

Caractères biochimiques des souches de *Leuconostoc* isolées du fromage de Roquefort

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Nombre de souches examinées	23	17	5	4
P. 100	47	35	10	8
Production de dextrane	+	+	—	—
Production d'acétoïne en milieu citraté	—	—	—	+
Production de gaz à partir des citrates	—	+	+	1/4
Production de catalase	—	—	—	—
Production de pseudocatalase (sur H.B. Agar)	—	—	—	—
Production de H ₂ O ₂ sur MDO Agar . .	—	—	—	—
Action sur le lait tournesolé	—	—	—	—
Action sur le lait supplémenté (glucose et extrait de levure)	A.C.R.	A.C. gaz	A.C. gaz	A.C
Production d'acide à partir de	L (+) Arabinose . .	+	4/5	—
	Xylose	15/17	+	—
	Glucose	+	+	+
	Lactose	14/17	3/5	+
	Mannitol	3/17	2/5	+
	Maltose	11/23	+	+
	Raffinose	2/23	+	—
	Saccharose	+	+	—
	Salicine	7/23	+	—
	Sorbitol	—	—	—
	Sorbose	—	—	—
	Tréhalose	+	+	—
	Cellobiose	5/23	15/17	3/5
	Melezitose	—	—	—
	Melibiose	2/23	13/17	3/5
Croissance à	10° C	+	+	+
	40° C	5/23	+	—
Croissance en présence de ClNa	4 p. 100	+	+	+
	6,5 p. 100	—	—	—
Désamination de l'arginine	—	—	—	—
Réduction des nitrates	—	—	—	—
Hydrolyse de l'esculine	—	9/17	4/5	—
Lipolyse	—	—	—	—
Configuration de l'acide lactique produit	D (—) 6/6	D (—) 6/6	D (—) 3/3	D (—) 2/2
Correspondance avec la classification de Garvie (1967)	<i>L. dextran- nicum</i>	<i>L. mesen- teroides</i>	<i>L. para- mesente- roides</i>	<i>L. lactis</i>

$$\text{fraction} = \frac{\text{nombre de souches positives}}{\text{nombre de souches essayées}}$$

de 36 heures d'incubation puis la viscosité diminuait très nettement ensuite. Pour les souches de *L. lactis*, la production d'acétoïne dans le milieu de Swartling était faible : cette production était très nettement augmentée lorsque l'on ajoutait au milieu des acides aminés (Casamino acids Difco n° 230).

Toutes les souches de *Leuconostoc* produisaient, en présence d'un sucre fermentescible, du gaz à partir du pyruvate mais non à partir du lactate. Les souches de *L. mesenteroides* et de *L. paramesenteroides* produisaient du gaz à partir du citrate et du malate en présence de tréhalose mais non en présence des pentoses.

c) Influence de différents micro-organismes de contamination sur les streptocoques lactiques et les *Leuconostoc*

1) EN CULTURE ASSOCIÉE

a) Action sur la croissance

En utilisant la technique de Vanderzant sur gélose nutritive (Plate Count Agar Difco n° 479), nous avons constaté que les colonies de streptocoques lactiques et de *Leuconostoc* apparaissaient plus rapidement lorsque ces germes étaient associés avec les souches de *Saccharomyces* sp., de *Saccharomyces lactis*, de *Hansenula* sp., de *Pichia* sp. et de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* que lorsque ces germes (streptocoques lactiques et *Leuconostoc*) étaient cultivés seuls sur ce même milieu. Dans le cas des streptocoques lactiques, la stimulation par les levures était particulièrement nette lorsque le rapport du nombre des levures au nombre des streptocoques lactiques était compris entre 1/1 et 1/100. Lorsque le nombre des levures était supérieur au nombre des streptocoques lactiques, aucun phénomène de stimulation n'apparaissait. Les souches de *Rhodotorula* sp. et de *Str. faecalis* n'avaient aucune action, ni stimulante ni inhibitrice.

b) Action sur la production d'acide

Nous avons constaté qu'en culture sur lait tournesolé, les *Leuconostoc* étaient très stimulés par les levures. Alors qu'aucune modification apparente n'était visible dans les tubes de lait tournesolé contenant soit les souches de levures seules, soit les souches de *Leuconostoc* seuls, le lait tournesolé ensemencé avec ces deux organismes était acidifié et coagulé en 72 heures. Les valeurs de pH des cultures associées étaient inférieures à 5, tandis que celles des cultures pures étaient de 6,6 - 6,8 unités pH.

Dans le tableau 4, nous avons porté, à titre d'exemple, l'acidité produite par les souches de streptocoques lactiques cultivées seules et en association avec une souche de *Saccharomyces lactis*. Il semblerait que l'action stimulante de *Saccharomyces lactis* soit plus marquée vis-à-vis des streptocoques faibles producteurs d'acide que vis-à-vis des streptocoques plus acidifiants. Des résultats sem-

TABLEAU 4

Action de *Saccharomyces lactis* R 82 sur la production d'acide
des streptocoques lactiques

Souches		Streptocoques lactiques seuls (1 p. 100)		Streptocoques lactiques (1 p. 100) + <i>Sacc. lactis</i> R 82 (1 p. 100)	
		Acidité après 6 heures d'incubation (°D)	Acidité après 24 heures d'incubation (°D)	Acidité après 6 heures d'incubation (°D)	Acidité après 24 heures d'incubation (°D)
<i>Str. lactis</i>	LR 1	33	72	40	84
	LR 2	35	71	45	85
	LR 3	30	74	43	91
	LR 4	18	22	32	71
	LR 5	18	36	29	77
<i>Str. cremoris</i>	CR 1	15	18	29	62
	CR 2	35	66	40	82
	CR 3	18	32	27	66
	CR 4	15	27	22	49
	CR 5	16	23	30	68

Température d'incubation : 30° C

Acidité produite par *Sacc. lactis* R 82 après 24 h d'incubation à 30° C : 18° D

Les valeurs d'acidité données correspondent à la moyenne de deux essais.

blables ont été obtenus avec les souches de *Saccharomyces* sp., de *Pichia* sp. et de *Hansenula* sp. Par contre, les souches de *Rhodotorula* sp. n'ont montré aucune action stimulante vis-à-vis de la production d'acide des streptocoques lactiques.

En utilisant la technique de Vanderzant avec une gélose au caséinate de sodium (Bacto Nutritive Caseinate Agar Difco n° 27) comme milieu de culture, nous avons constaté que les colonies de streptocoques lactiques stimulées par les souches de levures, étaient entourées d'une zone de précipitation, indice d'une forte production d'acide ($\text{pH} < 4,6$) tandis que celles des streptocoques témoins ne présentaient pas de zones de précipitation.

c) Action sur la production de gaz

Nous avons porté, dans les figures 1 et 2, à titre d'exemple, les courbes de production de gaz d'une souche de *L. mesenteroides* et d'une souche de *L. lactis*, cultivées seules ou associées à différentes souches de levures. Lorsque les souches de *Leuconostoc* sont associées aux souches de *Saccharomyces lactis*, nous constatons que la production de gaz est plus importante que lorsque ces micro-organismes sont cultivés séparément. En présence de la souche de

Hansenula sp. (qui seule ne produit pas de gaz dans le lait), la production de gaz des souches de *Leuconostoc* est nettement augmentée. Par contre, les souches de *Rhodotorula* essayées ne présentaient aucune action vis-à-vis des *Leuconostoc*.

Lorsque les souches de *Leuconostoc* étaient cultivées avec les souches de streptocoques lactiques ou d'entérocoques, les résultats

Figure 1

Production de gaz de *Leuconostoc mesenteroides* 47-1 en culture associée avec différentes levures

Inoculum : 1 p. 100

Température d'incubation : 22° C

Milieu de culture : lait autoclavé 20 mn à 118° C

- *L. mesenteroides* 47-1 + *Saccharomyces lactis* L. 310
- ▲---▲ *L. mesenteroides* 47-1 + *Saccharomyces lactis* R 82
- .-■ *L. mesenteroides* 47-1 + *Hansenula* sp. LS 4
- X.....X *L. mesenteroides* 47-1
- *Saccharomyces lactis* L. 310
- △---△ *Saccharomyces lactis* R 82
- .-□ *Hansenula* sp. LS 4

étaient variables. La production de gaz était plus importante lorsque les souches de *Leuconostoc* étaient cultivées avec les souches peu acidifiantes qu'avec les souches bonnes acidifiantes ; dans ce dernier cas, la production de gaz pouvait même être nulle.

Figure 2

Production de gaz de *Leuconostoc lactis* BB-6 en culture associée avec différentes levures

Inoculum : 1 p. 100

Température d'incubation : 22° C

Milieu de culture : lait autoclavé 20 mn à 118° C

- *L. lactis* BB-6 + *Saccharomyces lactis* L 310
- ▲---▲ *L. lactis* BB-6 + *Saccharomyces lactis* R 82
- .-■ *L. lactis* BB-6 + *Hansenula* sp. LS 4
- *Saccharomyces lactis* L 310
- △---△ *Saccharomyces lactis* R 82
- ▽-.-▽ *Hansenula* sp. LS 4
- ▼▼▼▼□ *L. lactis* BB-6

2) FILTRATS DE CULTURE

a) Action sur la croissance

Nous avons porté sur la figure 3, les courbes de croissance d'une souche de streptocoques lactiques sur du lactosérum (obtenu par action de la présure sur du lait reconstitué) avec ou sans addition de filtrat de culture sur lait de 2 souches de *Saccharomyces*. Nous voyons qu'en présence de ces filtrats de culture, la croissance du streptocoque lactique est stimulée ; la phase de latence est plus courte et le taux de croissance est plus élevé. Ces filtrats de

Figure 3

Action de filtrats de culture de levures sur la croissance
de *Streptococcus lactis* 27-2

Inoculum : 0,1 p. 100

Température d'incubation : 30° C

Milieu de culture : lactosérum obtenu par action de la présure sur lait reconstitué :

(a) : *Str. lactis* 27-2

(b) : *Str. lactis* 27-2 + 3 p.100 filtrat de culture de *Saccharomyces* sp. LG 8

(c) : *Str. lactis* 27-2 + 3 p.100 filtrat de culture de *Saccharomyces lactis* L 310.

culture présentaient également une action stimulante sur les autres souches de *Str. lactis* et *Str. cremoris* essayées. Les filtrats de culture de *Saccharomyces* sur lactosérum (obtenu par action de la présure sur lait reconstitué) stimulaient aussi la croissance des souches de streptocoques lactiques.

La figure 4 montre les courbes de croissance d'une souche de *L. mesenteroides* avec ou sans addition de filtrat de culture des

Figure 4

Action de filtrats de culture de levures sur la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* 47-1

Inoculum : 0,1 p. 100

Température d'incubation : 25° C

Milieu de culture : lactosérum obtenu par action de la présure sur lait reconstitué :

(a) : *L. mesenteroides* 47-1

(b) : *L. mesenteroides* 47-1 + 3 p. 100 filtrat de culture sur lactosérum de *Saccharomyces* sp. LG 8

(c) : *L. mesenteroides* 47-1 + 3 p. 100 filtrat de culture sur lactosérum de *Saccharomyces lactis* L 310

(d) : *L. mesenteroides* 47-1 + 3 p. 100 filtrat de culture sur lactosérum de *Hansenula* sp. LS 4

Le lactosérum utilisé pour la culture des levures et l'obtention de filtrats a été obtenu par action de la présure sur lait reconstitué.

souches de *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces* sp. et de *Hansenula* sp., la croissance de la souche de *L. mesenteroides* est très nettement stimulée ; on constate en effet un raccourcissement de la phase de latence, une augmentation du taux de croissance ainsi qu'une augmentation de la croissance totale.

Les figures 5 et 6 montrent les courbes de croissance d'une souche de *Str. lactis* et d'une souche de *L. mesenteroides* avec ou

Figure 5

Action de filtrats de culture de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4 sur la croissance de *Streptococcus lactis* 27-2

Inoculum : 0,1 p. 100

Température d'incubation : 30° C

Milieu de culture : lactosérum obtenu par action de la présure sur lait reconstitué :

(a) : *Str. lactis* 27-2

(b) : *Str. lactis* 27-2 + 3 p.100 filtrat de culture sur lait de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4

(c) : *Str. lactis* 27-2 + 3 p.100 filtrat de culture sur lactosérum de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4

Le lactosérum utilisé pour la culture de l'entérocoque et l'obtention de filtrat (c) a été obtenu par action de la présure sur lait reconstitué.

sans addition de filtrat de culture de la souche de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4. Nous voyons qu'en présence du filtrat de culture sur lait de cette souche d'entérocoques, la croissance des souches de *Str. lactis* et de *L. mesenteroides* est très nettement stimulée. Par contre, le filtrat de culture sur lactosérum de cette même souche d'entérocoques ne présente aucune action sur la croissance de la souche de *Str. lactis* et de la souche de *L. mesenteroides*.

Figure 6

Action de filtrats de culture de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4 sur la croissance de *Leuconostoc mesenteroides* 47-1

Inoculum : 0,1 p. 100

Température d'incubation : 25° C

Milieu de culture : lactosérum obtenu par action de la présure sur lait reconstitué :

(a) : *L. mesenteroides* 47-1

(b) : *L. mesenteroides* 47-1 + 3 p. 100 filtrat de culture sur lait de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4

(c) : *L. mesenteroides* 47-1 + 3 p. 100 filtrat de culture sur lactosérum de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4

Le lactosérum utilisé pour la culture de l'entérocoque et l'obtention de filtrat (c) a été obtenu par action de la présure sur lait reconstitué.

b) Action sur la production d'acide

Dans le tableau 5, nous avons porté l'acidité produite par 10 souches de streptocoques lactiques lorsqu'elles étaient cultivées seules ou en présence de filtrat de culture sur lait de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4. Nous voyons que la production d'acide est plus importante lorsque les souches de streptocoques lactiques sont cultivées en présence du filtrat de culture sur lait de la souche d'entérocoques.

TABLEAU 5

Action de filtrats de culture sur lait de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4 sur la production d'acide des streptocoques lactiques

Souches		Streptocoques lactiques seuls		Streptocoques lactiques + 5 p. 100 filtrat de culture <i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i> 35-P-4	
		Acidité après 6 heures d'incubation (°D)	Acidité après 24 heures d'incubation (°D)	Acidité après 6 heures d'incubation (°D)	Acidité après 24 heures d'incubation (°D)
<i>Str. lactis</i>	LR 1	33	72	36	80
	LR 2	35	71	39	82
	LR 3	30	74	37	84
	LR 4	18	22	25	45
	LR 5	18	36	25	55
<i>Str. cremoris</i>	CR 1	15	18	22	44
	CR 2	35	66	39	71
	CR 3	18	32	24	51
	CR 4	15	27	22	34
	CR 5	16	23	25	50

Température d'incubation : 30° C

Inoculum : 1 p. 100

Les valeurs d'acidité données correspondent à la moyenne de deux essais.

Des résultats semblables ont été obtenus lorsque les épreuves d'acidité étaient faites après incubation des souches de streptocoques lactiques en présence des filtrats de culture de levures.

c) Action sur la production de gaz

Dans les figures 7 et 8, nous avons porté les courbes de production de gaz de *L. mesenteroides* 47-1 en présence ou non de filtrats de culture de levures et de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4. Nous constatons que la production de gaz est stimulée par l'addition de

Figure 7

Action de filtrats de culture de levures sur la production de gaz
Leuconostoc mesenteroides 47-1

Inoculum : 1 p. 100

Température d'incubation : 22° C

Milieu de culture : lait autoclavé 20 mn à 118° C

- *L. mesenteroides* 47-1 + 1 p. 100 filtrat de culture sur lait de *Saccharomyces lactis* L 310
- *L. mesenteroides* 47-1 + 1 p. 100 filtrat de culture sur lait de *Hansenula* sp. LS 4
- Δ---Δ *L. mesenteroides* 47-1 + 1 p. 100 filtrat de culture sur lait de *Saccharomyces* sp. LG 8
- *L. mesenteroides* 47-1

ces filtrats de culture. Cependant, le filtrat de culture sur lactosérum de la souche d'entérocoques ne stimulait pas la production de gaz des *Leuconostoc*.

Figure 8

Action de filtrats de culture de *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4 sur la production de gaz de *Leuconostoc mesenteroides* 47-1 et de *Leuconostoc lactis* BB 6

Inoculum : 1 p. 100

Température d'incubation : 22° C

Milieu de culture : lait autoclavé 20 mn à 118° C

- *L. mesenteroides* 47-1 + 1 p. 100 filtrat de culture sur lait de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4
- *L. lactis* BB 6 + 1 p. 100 filtrat de culture sur lait de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* 35-P-4
- ▲---▲ *L. mesenteroides* 47-1
- *L. lactis* BB 6

TABLEAU 6
Action de différents micro-organismes vis-à-vis des streptocoques lactiques
et des *Leuconostoc*

			Streptocoques lactiques (10 souches)		<i>Leuconostoc</i> (5 souches)	
			Croissance	Production d'acide	Croissance	Production de gaz
LEVURES	Culture associée	<i>Saccharomyces</i> sp. (2 souches)	+	+	+	+
		<i>Saccharomyces lactis</i> (2 souches)	+	+	+	+
		<i>Hansenula</i> sp. (1 souche)	+	+	+	+
		<i>Pichia</i> sp. (1 souche)	+	+	+	+
		<i>Rhodotorula</i> sp. (2 souches)	0	0	+ (faible)	0
	Filtrat de culture sur lait	<i>Saccharomyces</i> sp.	+	+	+	+
		<i>Saccharomyces lactis</i>	+	+	+	+
		<i>Hansenula</i> sp.	+	+	+	+
		<i>Pichia</i> sp.	+	+	+	+
		<i>Rhodotorula</i> sp.	0	0	0	0
STREPTOCOQUES	Culture associée	<i>Saccharomyces</i> sp.	+	+	+	+
		<i>Saccharomyces lactis</i>	+	+	+	+
	Filtrat de culture sur lactosérum*	<i>Hansenula</i> sp.	+	+	+	+
		<i>Pichia</i> sp.	+	+	+	+
		<i>Rhodotorula</i> sp.	0	0	0	0
	Culture associée	<i>Streptococcus faecalis</i> (2 souches)	±		±	0
		<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i> (2 souches)	+		+	+
	Filtrat de culture sur lait	<i>Streptococcus faecalis</i>	0	0	0	0
		<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	+	+	+	+
Streptocoques lactiques	Filtrat de culture sur lactosérum*	<i>Streptococcus faecalis</i>	0	0	0	0
		<i>Str. faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	0	0	0	0
	Culture associée	<i>Streptococcus lactis</i> (5 souches)			+	V
		<i>Streptococcus cremoris</i> (5 souches)			+	V

+ : stimulation

0 : aucune action

± : douteux

V : variable

* : le lactosérum utilisé pour la culture des micro-organismes et la préparation du filtrat a été obtenu par action de la présure sur lait reconstitué.

Dans le tableau 6, nous avons résumé les résultats des actions des différents organismes essayés vis-à-vis des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc* isolés du fromage de Roquefort.

DISCUSSION

a) Les streptocoques lactiques

Les streptocoques lactiques que nous avons isolés du fromage de Roquefort appartiennent aux espèces *Str. lactis* et *Str. cremoris*. Au cours de cette étude nous n'avons pas mis en évidence la présence de *Str. diacetylactis*. Il est probable que, si ces micro-organismes sont présents dans le fromage de Roquefort, ils se trouvent en flore sous-dominante par rapport aux deux autres espèces de streptocoques lactiques et leur rôle peut être, de ce fait, considéré comme secondaire.

Les souches de *Str. lactis* et de *Str. cremoris* que nous avons isolées correspondent bien à la définition de ces espèces. Nous n'avons pas mis en évidence la présence de souches susceptibles de se développer en présence de teneurs en ClNa aussi élevées que celles que nous trouvons après le salage (jusqu'à 20 p. 100 de ClNa dans la phase aqueuse). Il est donc vraisemblable que ces micro-organismes trouvent dans le fromage des conditions qui leur permettent, non seulement de se maintenir, mais aussi de se multiplier en présence de fortes teneurs en chlorure de sodium. Nous pensons que ces conditions favorables proviennent de l'action d'autres micro-organismes. Le fait que, lors des fabrications en lait pasteurisé de fromage bleu (c'est-à-dire en l'absence de nombres importants de micro-organismes de contamination), les streptocoques lactiques disparaissent après le salage (Babel, 1953) confirmerait notre hypothèse. Il est possible que ces conditions favorables proviennent en partie de l'action de micro-organismes protéolytiques. En effet, Rasic *et al.* (1965) ont montré que des substances azotées, telles que des peptones, étaient susceptibles d'augmenter la résistance au sel des ferments d'arôme.

La production d'acide à partir du lactose est, technologiquement, le caractère le plus important des streptocoques lactiques. A cet égard, deux types de streptocoques ont été isolés du fromage de Roquefort : les uns, moyennement acidifiants, coagulent le lait en 24 heures, les autres, très mauvais producteurs d'acide, coagulent le lait en plus de 72 heures. Or, dans le fromage, ces streptocoques provoquent l'acidification souhaitée, lente mais suffisante. Cette acidification doit être en effet lente ; si elle se produit trop rapidement, le caillé a lui aussi tendance à s'égoutter très rapidement, 24 heures après l'emprésurage, le fromage est « tassé », sans aucune ouverture, ce qui a pour conséquence un mauvais développement ultérieur du *Penicillium*. L'acidification doit être aussi suffisante de façon à

amener, 48 heures après l'emprésurage, le pH du fromage en-dessous de 5,0, ce qui a pour résultat d'éliminer les micro-organismes acidosensibles indésirables (bactéries coliformes par exemple).

Plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer la différence de comportement des streptocoques lactiques au laboratoire et dans le fromage de Roquefort. Des phénomènes de stimulation peuvent se produire, soit entre les différentes souches de streptocoques lactiques, soit entre les micro-organismes de contamination du lait et les streptocoques lactiques.

En ce qui concerne la possibilité d'une stimulation entre les streptocoques lactiques, plusieurs mélanges de souches ont été essayés, mais l'amélioration de la production d'acide a toujours été faible et, dans tous les cas, très nettement inférieure à ce que l'on observe dans le fromage. Nous ne devons pas, toutefois, rejeter l'hypothèse d'une stimulation entre les streptocoques lactiques. Les mélanges de souches que nous avons étudiés ont été faits de façon à mettre en présence, soit uniquement des souches peu acidifiantes, soit des souches moyennement acidifiantes, soit un nombre égal de chacun de ces types. Or il est certain que s'il existe une stimulation entre les souches de streptocoques lactiques, on peut envisager le processus de stimulation comme étant le suivant : certains streptocoques secrètent dans le lait des substances qui sont utilisées par d'autres souches de streptocoques lactiques. Il serait donc nécessaire, pour faire des mélanges de souches, de connaître les besoins nutritifs de ces souches.

En ce qui concerne la possibilité d'une stimulation des streptocoques lactiques par des micro-organismes de contamination, nos résultats ont montré que certaines souches de levures et de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* étaient capables de stimuler la production d'acide des streptocoques lactiques. Il est bien connu que les autolysats de levures apportent des facteurs de croissance et ces produits sont couramment utilisés dans la préparation des milieux de culture. Or, le problème est différent dans le cas de l'acidification du caillé du fromage de Roquefort par les streptocoques lactiques. Au cours des 24 premières heures qui suivent l'emprésurage, nous assistons à une multiplication importante des levures ; de 10^2 dans le lait, ces organismes atteignent 10^6 après 24 heures (Devoyod *et al.*, 1968). Si certaines de ces cellules meurent, on peut admettre que l'autolyse est relativement faible à ce stade. Il est donc vraisemblable que ce sont des substances exogènes secrétées par les levures qui ont une action vis-à-vis des streptocoques lactiques. Or, le fait qu'inoculées simultanément dans le lait avec des streptocoques lactiques, des souches de *Saccharomyces* sp., de *Saccharomyces lactis*, de *Hansenula* sp. et de *Pichia* sp. sont capables d'augmenter la production d'acide des streptocoques lactiques, permet de penser que ces levures peuvent sécréter dans le lait des substances stimulantes vis-à-vis des streptocoques lactiques. Peppler et Frazier (1943)

ont montré que des filtrats de culture sur lait de *Candida krusei* stimulaient la production d'acide des streptocoques thermophiles. En fabrication traditionnelle, cette stimulation est essentiellement due à l'action des levures appartenant au genre *Saccharomyces* et plus particulièrement à l'espèce *lactis*. Une étude faite sur les levures du fromage de Roquefort, étude qui sera publiée ultérieurement, a montré que les levures appartenant au genre *Saccharomyces* étaient prédominantes au cours des premiers stades de la fabrication, tandis que les levures appartenant aux genres *Hansenula* et *Pichia* ne devenaient dominantes qu'après le salage, lorsque la phase d'acidification du fromage est terminée. Mais il n'est pas interdit de penser que l'on puisse utiliser ces levures pour stimuler la production d'acide des streptocoques lactiques.

Parmi les entérocoques, les souches de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* ont montré une action stimulante marquée vis-à-vis des streptocoques lactiques. Il est vraisemblable qu'en fabrication traditionnelle, leur action précède celle des levures ; ces micro-organismes sont en effet plus nombreux (10^6 /ml) dans les laits de fabrication que les levures. Le caractère fortement protéolytique des souches de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, le fait que les filtrats de culture de ces organismes sur le lait, et non le filtrat de ces mêmes organismes sur lactosérum, présentent une action stimulante vis-à-vis des streptocoques lactiques, permet de penser que les substances stimulantes exogènes produites par les souches de *Str. faecalis* var. *liquefaciens* proviennent de la dégradation de la caséine par ces organismes.

Au cours de cette étude, nous avons confirmé des résultats antérieurs (Devoyod et Bret, 1966), à savoir que les streptocoques lactiques, dans le fromage de Roquefort, ne disparaissent pas après le salage et qu'ils constituent la flore microbienne dominante au centre du fromage tout au long de l'affinage. Il semble toutefois que le salage a une action sélective vis-à-vis de ces streptocoques lactiques ; les souches que l'on trouve au cours de l'affinage sont toutes du type « peu acidifiant ». Ces streptocoques lactiques se trouvent alors non seulement associés à des germes qui stimulent leur croissance (*Hansenula*, *Pichia*, *Str. faecalis* var. *liquefaciens*), mais ils trouvent dans le milieu des facteurs de croissance, des acides aminés essentiels provenant de la lyse des micro-organismes par action du sel (*Saccharomyces lactis* et streptocoques lactiques moyennement acidifiants entre autres). Cette source de facteurs stimulants est certainement loin d'être négligeable. Hansen (1941) a montré que les autolysats de cellules de *Str. cremoris* et de *Str. lactis* stimulaient le développement de *Lactobacillus casei* et de *Betacoccus cremoris*. Or, nous avons constaté que les lactobacilles et en particulier *Lb. casei* se multipliaient dans le fromage de Roquefort, 10 jours après le salage.

b) Les *Leuconostoc*

Les *Leuconostoc* que nous avons isolés du fromage de Roquefort appartiennent surtout aux espèces *L. dextranicum* et *L. mesenteroides*. Les espèces couramment utilisées dans la préparation des levains commerciaux (*L. cremoris* essentiellement) ne sont pas présentes dans les souches isolées, ou seulement en faible proportion (*L. lactis* : 8 p. 100). Le fait que les fabrications traditionnelles que nous avons suivies ont donné des fromages classés en qualité « extra », semble indiquer que *L. cremoris* et *L. lactis* ne sont certainement pas indispensables en fabrication traditionnelle de fromage de Roquefort.

La production de diacétyl est le caractère que l'on recherche chez les streptocoques hétéro-fermentaires qui sont couramment utilisés en technologie fromagère comme ferments d'arôme. Dans les fabrications traditionnelles de fromage de Roquefort, il ne semble pas que la production de diacétyl soit un caractère important pour la qualité du fromage. Nous n'avons pas trouvé de *Str. diacetylactis* dans les flores lactiques naturelles et *L. lactis* ne représente qu'une faible partie des *Leuconostoc* isolés du fromage de Roquefort. Certaines souches de *L. dextranicum* étaient capables de fermenter les citrates, mais aucune ne produisait du diacétyl.

Par contre, la production de gaz par les *Leuconostoc* semble être un caractère qui a un rôle important dans la fabrication du fromage de Roquefort. Pour que le *Penicillium* puisse se développer dans le fromage et donner son aspect « persillé » caractéristique, il est nécessaire que le caillé soit « ouvert ». Cette ouverture, que l'on observe au cours des 48 premières heures qui suivent l'emprésurage (ouverture qu'il ne faut pas confondre avec le gonflement dû à la prolifération des bactéries coliformes et qui est un défaut de fabrication), semble être due, en partie tout au moins, à l'action des *Leuconostoc*. La production de CO₂ par les *Leuconostoc* se fait à partir de deux substrats distincts : soit à partir de l'acide citrique, soit à partir des sucres (lactose essentiellement).

Nos résultats ont montré que les *Leuconostoc* cultivés seuls produisaient peu ou pas de gaz, mais qu'en présence de souches de levures ou de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, la production de gaz des *Leuconostoc* était très nettement stimulée. Holmes et al. (1968) ont montré que l'extrait de levures stimulait la production de CO₂ de *L. citrovorum*. Comme ces auteurs, nous avons constaté que les *Leuconostoc* ne produisaient du gaz que lorsque leur population atteignait 10⁸ germes/ml environ, or nos résultats montrent que des souches de levures et de certains entérocoques sont susceptibles de sécréter des substances qui stimulent la croissance des *Leuconostoc*. Cultivés avec les streptocoques lactiques, nous avons constaté que la production de gaz des *Leuconostoc* était variable ; mais, en règle générale, plus les streptocoques étaient acidifiants, moindre était

la production de gaz. Les *Leuconostoc* que nous avons étudiés produisent du CO₂ essentiellement à partir des sucres. Les streptocoques lactiques très acidifiants utilisent rapidement le lactose ; il est possible qu'en association avec ces germes, le seuil de 10⁸ *Leuconostoc* par ml (seuil en dessous duquel aucune production de gaz n'est possible) ne soit atteint que lorsqu'une partie importante du lactose est déjà métabolisée en acide lactique par les streptocoques lactiques. Cette hypothèse semble être vérifiée dans les fabrications traditionnelles où nous observons une bonne ouverture lorsque l'acidification est lente, c'est-à-dire lorsque la diminution de la teneur en sucre est elle-même lente.

Nous avons vu que les souches de *Saccharomyces lactis* stimulaient la production de gaz des *Leuconostoc*. Or ces levures sont capables elles aussi de produire du CO₂ à partir du lactose ; elles interviennent certainement dans l'ouverture. Il est concevable qu'une acidification trop rapide ne soit pas souhaitable car non seulement elle entraîne une modification de la texture du caillé, mais aussi elle nuit à la production de CO₂ à partir du lactose. Dans les fabrications traditionnelles de fromage de Roquefort que nous avons étudiées, la production de gaz se faisait en majeure partie à partir du lactose. Cela peut présenter des inconvénients, car des germes indésirables (bactéries coliformes par exemple) sont susceptibles d'utiliser aussi le lactose et de provoquer des accidents de fabrication. Il serait souhaitable que la production de gaz recherchée se fasse essentiellement à partir de l'acide citrique ; dans ce cas, *Str. diacetylactis* et surtout *L. cremoris* et *L. lactis* devraient jouer un rôle important.

Dans les fabrications traditionnelles normales de fromage de Roquefort, nous avons vu que les *Leuconostoc* et les levures avaient une action certaine sur l'ouverture. Dans d'autres types de fromages fabriqués à partir de lait cru (pâtes molles, pâtes pressées), nous trouvons également des *Leuconostoc* et des levures ; or ces fromages normalement ne présentent pas d'ouverture. Il est vraisemblable qu'à côté de toute action microbienne le processus technologique a un rôle important. Dans le cas du fromage de Roquefort, le morcellement du caillé lors de la mise en moule est certainement un facteur non négligeable de l'ouverture.

Résumé

Quatre-vingt-quatorze souches de streptocoques lactiques et 49 souches de *Leuconostoc* ont été isolées du fromage de Roquefort. Les streptocoques que l'on trouve en flore dominante au centre du fromage après le salage et au cours de l'affinage sont de faibles producteurs d'acide. *L. dextranicum* et *L. mesenteroides* sont les espèces de *Leuconostoc* les plus nombreuses.

Parmi les micro-organismes de contamination du lait de brebis, les souches de *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, de *Saccharomyces* sp., de *Saccharomyces lactis*, de *Hansenula* sp. et de *Pichia* sp. avaient une action stimulante vis-à-vis de la croissance des streptocoques lactiques et des *Leuconostoc*, vis-à-vis de la production d'acide des streptocoques lactiques et de la production de gaz des *Leuconostoc*.

Microbial flora of Roquefort cheese

III. Lactic streptococci and Leuconostoc. Influence of various contaminating organisms

Summary

94 strains of lactic streptococci and 49 strains of *Leuconostoc* were isolated from Roquefort cheese. The lactic streptococci, found in great number in the inner part of the cheese after salting and during ripening, are weak acid-producing strains. *L. dextranicum* and *L. mesenteroides* are the more numerous species of *Leuconostoc* found in Roquefort cheese.

Among the contaminating microorganisms of ewe's milk, strains of *Str. faecalis* var. *liquefaciens*, *Saccharomyces* sp., *Saccharomyces lactis*, *Hansenula* sp. and *Pichia* sp. stimulated the growth of lactic streptococci and *Leuconostoc*, the production of acid by lactic streptococci and the production of gaz by *Leuconostoc*.

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 M. Auclair pour ses suggestions et ses critiques qui ont été pour nous une aide précieuse dans l'élaboration et la présentation de ce travail.

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, p. 233.
- [2] BABEL (F.J.) (1953). — The role of fungi in cheese ripening. *Econ. Bot.*, 7, p. 27.
- [3] BARRITT (M.M.) (1936). — The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of α -naphtol. *J. Path. Bact.*, 42, p. 441.
- [4] BRITISH STANDARDS INSTITUTION (1940). — Stand. Specif. n° 895. Methods for the microbiological examination of butter.
- [5] CLAYDON (T.J.) et KOBURGER (J.A.) (1961). — Stimulation of lactic starter cultures by filtrates from milk cultures of *Pseudomonas fluorescens*. *J. appl. Microbiol.*, 9, p. 117.

- [6] Mc CLESKEY (C. S.), FAVILLE (L. W.) et BARNETT (R. O.) (1947). — Characteristics of *Leuconostoc mesenteroides* from cane juice. *J. Bact.*, 54, p. 697.
- [7] 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^e Cong. Int. Laiterie, D 62, p. 585.
- [8] DEVOYOD (J. J.), BRET (G.) et AUCLAIR (J. E.) (1968). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. I. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage du fromage. *Le lait*, 479-480, p. 613.
- [9] DEVOYOD (J. J.) (1969). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. Les Entérocoques. *Le Lait* (sous presse).
- [10] FOURNAUD (J.) (1967). — Communication personnelle.
- [11] FRAZIER (W. C.) (1926). — A method for the detection of changes in gelatin due to bacteria. *J. inf. Dis.*, 39, p. 302.
- [12] GARVIE (E. I.) (1960). — The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. *J. Dairy Res.*, 27, p. 283.
- [13] GARVIE (E. I.) (1967a). — *Leuconostoc oenos* sp. nov. *J. gen. Microbiol.*, 48, p. 431.
- [14] GARVIE (E. I.) (1967b). — The growth factor and amino acid requirements of species of the genus *Leuconostoc*, including *Leuconostoc paramesenteroides* (sp. nov.) and *Leuconostoc oenos*. *J. gen. Microbiol.*, 48, p. 439.
- [15] HALL (N. J.) (1956). — Influence of *Bacterium coli* on starter production. *Proc. Intern. Dairy Congr., Rome*, 2, p. 221.
- [16] HAMMER (B. W.) (1920). — Volatile acid production of *S. lacticus* and the organisms associated with it in starters. *Res. Bull. Agr. Exp. Sta.*, n° 63.
- [17] HANSEN (P. A.) (1941). — A study in cheese ripening. The influence of autolysed cells of *Streptococcus cremoris* and *Streptococcus lactis* on the development of *Lactobacillus casei*. *J. Dairy Sci.*, 24, p. 969.
- [18] HOLMES (B.), SANDINE (W. E.) et ELLIKER (P. R.) (1968). — Some factors influencing carbon dioxide production by *Leuconostoc citrovorum*. *Appl. Microbiol.*, 16, p. 56.
- [19] HUCKER (G. J.) et PEDERSON (C. S.) (1930). — Studies on the *Coccaceae*. XVI. The genus *Leuconostoc*. *N. Y. Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.*, 167, p. 1.
- [20] DE MAN (J. C.), ROGOSA (M.) et SHARPE (E.) (1960). — A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. appl. Bact.*, 23, p. 130.
- [21] MAYEUX (J. V.) et COLMER (A. R.) (1961). — Selective medium for *Leuconostoc* detection. *J. Bact.*, 81, p. 1009.
- [22] MAYEUX (J. V.), SANDINE (W. E.) et ELLIKER (P. R.) (1962). — A selective medium for detecting *Leuconostoc* organisms in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 45, p. 655.
- [23] 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, p. 265.
- [24] NIVEN (C. F.) Jr., SMILEY (K. L.) et SHERMAN (J. M.) (1942). — The hydrolysis of arginine by streptococci. *J. Bact.*, 43, p. 651.
- [25] ORLA-JENSEN (S.) (1904). — Studien über die flüchtigen Fettsäuren in Käse nebst Beiträgen zur Biologie des Käsefermente. *Centralbl. Bakt., II Abt.*, 13, p. 428 (Communiqué par J. C. DE MAN).
- [26] PEPPLER (H. J.) et FRAZIER (W. C.) (1943). — Influence of a film yeast, *Candida krusei*, on the heat resistance of certain lactic acid bacteria grown in symbiosis with it. *J. Bact.*, 45, p. 181.

- [27] RAIBAUD (P.), DICKINSON (A. B.), SACQUET (E.), CHARLIER (H.) et MOCQUOT (G.) (1966). — La microflore du tube digestif du rat. I. Technique d'étude et milieux de culture proposés. *Ann. Inst. Pasteur*, 110, p. 568.
- [28] RASIC (J.), OBRADOVIC (B.) et MITIG (S.) (1965). — Effect of peptone on the resistance of aroma producing bacteria to sodium chloride. *Milchwissenschaft*, 20, p. 341.
- [29] RICE (E. B.) (1949). — Studies on starters. VI. Further observations on associative growth of lactic streptococci with other bacteria. *Dairy Ind.*, 14, p. 498.
- [30] ROSEBURY (T.), GALE (D.) et TAYLOR (D. F.) (1954). — An approach to the study of interactive phenomena among microorganisms indigenous to man. *J. Bact.*, 67, p. 135.
- [31] SEVEL (B.) et PLOMMET (M.) (1960). — Adaptation d'un milieu sélectif à l'isolement des staphylocoques de mammite. Application au diagnostic d'étable. *Le Lait*, 40, p. 2.
- [32] SHATTOCK (P. M. F.) (1949). — The streptococci of group D ; the serological grouping of *Str. bovis* and observations on serological refractory group D strains. *J. gen. Microbiol.*, 3, 80.
- [33] SHAW (C.), STITT (J. M.) et COWAN (S. T.) (1959). — Staphylococci and their classification. *J. gen. Microbiol.*, 5, p. 1 010.
- [34] SWARTLING PER. (F.) (1951). — Biochemical and serological properties of some citric acid fermenting streptococci from milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 18, p. 256.
- [35] TURNER N., SANDINE (W. E.) et ELLIKER (P. R.) (1962). — An agar medium for differentiating *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J. Dairy Sci.*, 45, p. 656.
- [36] VAN DER ZANT (C.) (1968). — Interactive phenomena among bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.*, 51, p. 991.
- [37] WHITTENBURY (R.) (1964). — Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. *J. gen. Microbiol.*, 35, p. 13.
- [38] WHITTENBURY (R.) (1966). — A study of the genus *Leuconostoc*. *Arch. Mikrobiol.*, 53, p. 317.

Reçu pour publication en mars 1969.