



HAL
open science

Nature et variabilité de la flore microbienne dans la morge des fromages de Comté et de Beaufort

C Piton-Malleret, M Gorrieri

► **To cite this version:**

C Piton-Malleret, M Gorrieri. Nature et variabilité de la flore microbienne dans la morge des fromages de Comté et de Beaufort. *Le Lait*, 1992, 72 (2), pp.143-164. hal-00929283

HAL Id: hal-00929283

<https://hal.science/hal-00929283>

Submitted on 11 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Nature et variabilité de la flore microbienne dans la morge des fromages de Comté et de Beaufort

C Piton-Malleret ^{1*}, M Gorrieri ²

¹ INRA, station de recherches en technologie et analyses laitières, BP 89, 39801 Poligny Cedex;

² Union des producteurs de Beaufort, 1 rue du Château, 73000 Chambéry, France

(Reçu le 29 avril 1991; accepté le 4 novembre 1991)

Résumé — La flore microbienne de la morge a été étudiée dans 9 fromageries de Comté et 4 fromageries de Beaufort, à 2 saisons de fabrication et à 2 stades de l'affinage des fromages. Les 52 échantillons, prélevés par grattage à sec à la surface d'un lot de 4 meules, ont été soumis à une détermination du pH et de l'activité de l'eau selon la méthode par interpolation de Landrock et Proctor, ainsi qu'au dénombrement des 4 groupes microbiens suivants : «flore totale» sur milieu salé au lactate, flore bactérienne halotolérante sur Mannitol Salt Agar (MSA) tamponné additionné d'amphotéricine B, levures et flore bactérienne résistant au cristal violet; sur milieu au lactate et sur MSA tamponné, on a procédé à la numération des 3 principaux groupes pigmentaires (colonies orange, non pigmentées et jaunes). Pour chaque échantillon, 20 colonies orange ou non pigmentées sur MSA tamponné et 4 colonies jaunes opaques sur milieu salé au lactate ont été prélevées et soumises, après purification, aux tests suivants : morphologie et mobilité des cellules après 24 h et une semaine de culture, réaction de Gram, résistance à la pénicilline G et à l'acide nalidixique, culture et acidification du milieu MSA. Les niveaux atteints dans la morge du Comté sont en moyenne de $1,6 \cdot 10^9$ et de $8,1 \cdot 10^9$ micro-organismes/cm², respectivement après 15 j et 2 mois d'affinage des fromages; la morge du Beaufort est caractérisée par des niveaux en moyenne plus élevés : respectivement $4,7 \cdot 10^9$ et $1,4 \cdot 10^{10}$ UFC/cm² après 30 j et 4 mois d'affinage. Quel que soit le groupe pigmentaire, les souches appartiennent essentiellement à 2 grands groupes bactériens : les bactéries corynéformes et les *Micrococcaceae*. Hormis pour la flore jaune, les bactéries corynéformes constituent la flore dominante et la proportion de *Micrococcaceae* diminue au cours de l'affinage. Les corrélations entre variables prises 2 à 2 ont été calculées à chaque stade d'affinage. Aucune relation significative n'a été établie entre le pH et le niveau des levures, ni entre le niveau des levures et celui des autres groupes de micro-organismes. Par contre, en début d'affinage, des corrélations élevées ont été mises en évidence entre le pH et le niveau des différents groupes pigmentaires appartenant à la flore halotolérante ou entre les niveaux de ces différents groupes pigmentaires; ces corrélations significatives disparaissent le plus souvent en fin d'affinage. Pour le fromage de Comté, une relation significative a également été notée en début d'affinage, entre l'activité de l'eau de la croûte et les niveaux des bactéries résistant au cristal violet et de la flore bactérienne jaune opaque sur MSA. Une analyse de variance à 3 voies a permis de tester l'influence de la fromagerie, du stade d'affinage et de la saison de fabrication sur les niveaux des différents groupes microbiens, séparément pour la morge du Comté et du Beaufort. Enfin, une analyse en composantes principales a mis en évidence

* Adresse actuelle : INRA, laboratoire de recherches sur la viande, 78352 Jouy-en-Josas Cedex, France

les variables permettant de différencier la morge du Beaufort de celle du Comté, et de caractériser les différents types d'affinage des fromages de Comté.

Comté / Beaufort / morge / flore microbienne / microcoque / corynéforme / Aw / pH / stade d'affinage / fromagerie / saison de fabrication / variabilité

Summary — Nature and variability of the microbial flora in the Comté and Beaufort cheese smear. Smear microbial flora have been studied from 9 Comté cheese and 4 Beaufort cheese plants, at 2 seasons and 2 stages of the ripening period. The 52 samples, taken by scratching the surface of 4 wheels, were submitted to pH and water activity determination according to the graphic interpolation method of Landrock and Proctor, and to enumeration of the following microbial groups: "total flora" on salted lactate medium, salt-tolerant bacteria on buffered mannitol salt agar (MSA) supplemented with amphotericin B, yeasts and crystal violet-resistant bacteria. Three pigment groups (orange, non-pigmented and yellow colonies) were counted separately on salted lactate medium and buffered MSA. For each sample, 20 orange or non-pigmented colonies on buffered MSA and 4 yellow colonies on salted lactate medium were isolated and submitted to the following tests: cell morphology and motility after 1 day and 1 week of growth, Gram reaction, resistance to penicillin G and nalidixic acid, growth on MSA and acidification of the medium. Mean levels of 1.6×10^9 and 8.1×10^9 microorganisms/cm² were reached in the Comté cheese smear, after 15 days and 2 months respectively of ripening; Beaufort smear was characterized by somewhat higher levels: 4.7×10^9 and 1.4×10^{10} UFC/cm² after 30 days and 4 months respectively of ripening. Whatever the pigment group, the flora was essentially composed of coryneform bacteria and Micrococcaceae. Except for the yellow strains, coryneform bacteria dominated and the proportion of Micrococcaceae decreased during the ripening period. The correlations between variables were calculated at each stage of the ripening period. No significant relation was noted between pH and yeast levels, or between the yeasts and the other main microbial groups. On the contrary, at the beginning of the cheese ripening period, high correlations were observed between pH and the levels of the main pigment groups of salt-tolerant bacteria, and between the levels of these different groups; these correlations generally disappeared at the end of the cheese ripening period. For Comté cheese, a significant relation was also noted at the beginning of the ripening period between the smear water activity and the levels of crystal violet-resistant bacteria and yellow-pigmented flora. A 3-way analysis of variance allowed testing of the effect of the cheese plant, ripening stage and cheese-making season on the levels of the different microbial groups, both in Comté and in Beaufort cheese smear. Principal components analysis was then carried out, which displayed the variables permitting differentiation between the Comté and Beaufort cheese smear, and characterization of the different ripening types of Comté cheese.

Comté / Beaufort / smear / microbial flora / Micrococcaceae / coryneform bacteria / Aw / pH / ripening stage / cheese plant / cheese-making season / variability

INTRODUCTION

La morge est l'enduit superficiel riche en micro-organismes qui se forme au cours de l'affinage des fromages de Comté et de Beaufort en raison des salages et frottages prodigués en cave. Plusieurs rôles ont déjà été attribués aux micro-

organismes de la morge (Dumont *et al*, 1975 et 1981; Blanc *et al*, 1983; Meyer *et al*, 1985) mais leur influence sur les qualités organoleptiques de la partie centrale du fromage de Comté n'a pu être clairement mise en évidence (Dasen *et al*, résultats non publiés), probablement en raison de la diffusion peu importante des en-

zymes produites par ces microorganismes à l'intérieur de la pâte du fromage (Meyer *et al.*, 1985). Toutefois, les professionnels semblent accorder à la morge un intérêt de plus en plus grand, en raison du caractère spécifique qu'elle donne à ce type de fromage et aussi, du déclassement des meules présentant un croûtage défec-tueux.

Dans une précédente étude effectuée dans 6 fromageries (Piton, 1988), nous avons montré que la flore microbienne s'implante très rapidement à la surface du Gruyère de Comté à des niveaux très élevés, avec une succession levures / bactéries; après 15–30 j d'affinage, la flore bactérienne halotolérante domine et se stabilise à son niveau maximal (environ 10^9 – 10^{10} microorganismes/cm² de croûte). Cette flore est composée essentiellement de bactéries corynéformes qui appartiennent à 3 grands groupes pigmentaires et qui se maintiennent à un niveau constant tout au long de l'affinage et quelle que soit la fromagerie. En étudiant les propriétés physiologiques et/ou biochimiques de cette flore corynéforme, Piton et Fontanier (1990) ont montré qu'il ne semble pas exister de spécificité des souches selon l'origine des fromages. À l'inverse, ils ont mis en évidence des successions de flores au cours de l'affinage puisque certains types de bactéries corynéformes sont rencontrés plus fréquemment en début ou en fin d'affinage des fromages.

L'objectif de cette nouvelle étude a donc été de confirmer ces observations sur un plus grand nombre de fromages d'origines diverses et à 2 saisons de fabrication différentes. D'autre part, nous avons voulu étendre cette expérimentation à un autre type de fromage à pâte cuite emmorgée, le Beaufort, qui présente une conduite d'affinage différente du Comté. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la variabilité des niveaux atteints par les

principaux groupes de microorganismes à 2 stades de l'affinage des fromages, ainsi qu'à l'influence de la fromagerie, du type d'affinage et de la saison sur ces niveaux. Par ailleurs, nous avons également étudié plus spécifiquement la nature de la flore bactérienne halotolérante de la morge de ces fromages et sa variabilité.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des échantillons

Neuf fromageries artisanales à Comté (F₁–F₉) ont été sélectionnées. Trois d'entre elles (F₁–F₃) étaient situées autour de Poligny (Jura) et les 6 autres dans le département du Doubs. Elles livraient leurs fromages chez 3 affineurs différents. Deux affineurs, A₁ pour les fromageries F₁, F₂ et F₃ et A₂ pour les fromageries F₄, F₅ et F₆, avaient une technique classique d'affinage. Celle-ci consistait tout d'abord en un préaffinage de 2–3 semaines à la fromagerie à une température de 12–15 °C, suivi d'un affinage en cave chaude à 17–18 °C pendant 2 mois environ et enfin d'un séjour en cave froide à 8–12 °C, qui peut durer de 2–6 mois. Pour l'affineur A₃, les meules étaient maintenues à une température inférieure à 10 °C tout au long de l'affinage, après une période de préaffinage à 12–15 °C chez le fromager (fromageries F₇, F₈ et F₉). Dans tous les cas, les meules subissaient des soins manuels : frottages au gros sel et retournements 2–3 fois par semaine en début d'affinage, soins moins fréquents après un mois d'affinage.

De la même façon, 4 fromageries à Beaufort ont été choisies (F₁₀–F₁₃). L'affinage du Beaufort est caractérisé par un saumurage de 24 h puis un affinage à une température de 8–12 °C jusqu'à sa commercialisation.

Dans chaque coopérative, les prélèvements ont porté sur un même lot de 4 fromages à 2 stades. Pour le stade 1, les prélèvements ont eu lieu 15 et 30 j après la fabrication, respectivement pour les fromages de Comté et pour ceux de Beaufort; au stade 2, ils ont été effectués 2 mois après la fabrication pour les fromages de

Comté des affineurs A₁ et A₂ et 4 mois après la fabrication pour le Beaufort et les fromages de Comté de l'affineur A₃. Les stades d'analyse sont volontairement différents en Comté et en Beaufort, en raison des températures d'affinage très différentes. Par ailleurs, les prélèvements ont eu lieu à 2 saisons : sur des fromages d'hiver (fabrication en janvier-février) et sur des fromages d'été (fabrication en août).

Prélèvement des échantillons

Deux types de prélèvements ont été nécessaires dans le cadre de cette expérimentation. Ils étaient toujours effectués sur la face qui avait subi, depuis plus de 24 h, les derniers soins apportés au fromage.

Les dénombrements microbiens et la mesure de pH étaient effectués par grattage à l'aide d'une spatule désinfectée à l'alcool, dans 6 carrés de 5 cm de côté; la morge recueillie sur les 4 fromages était réunie pour former un échantillon moyen par fromagerie. Pour la mesure de l'activité de l'eau, 9 «languettes» de croûte d'environ 1,5 x 3 cm sur 1-2 mm d'épaisseur (soit environ 0,3 g) étaient découpées à l'aide d'un scalpel sur un des fromages du lot et placées immédiatement dans du papier aluminium sulfurisé.

Les échantillons étaient conservés dans une caisse isotherme entre 0 et 4 °C jusqu'au moment de l'analyse, qui avait lieu au plus tard 12 h après le prélèvement.

Dénombrements microbiens

À l'arrivée au laboratoire, les échantillons de morge prélevés par grattage étaient pesés de façon à exprimer les résultats de dénombrements en unités formant colonies par cm² de surface de croûte (UFC/cm²); cela permettait ainsi de s'affranchir des variations du poids de morge récoltée par unité de surface ou d'extrait sec de la morge, d'une fromagerie à l'autre et d'un stade d'affinage à l'autre (Dasen *et al.*, résultats non publiés).

Une fraction représentative de l'échantillon était ensuite pesée dans un flacon contenant du milieu Brain Heart Infusion * et homogénéisée à l'aide d'une turbine tournant à 20 000 t/min (appareil Ultraturrax, type TP 18/2), pour obtenir une suspension homogène et assurer une dispersion maximale des amas microbiens (Richard, 1980; Piton, 1988).

En attendant l'analyse microbiologique, les suspensions étaient conservées à 0 °C dans de la glace fondante, pendant 1 h au maximum. Les dilutions suivantes étaient réalisées dans de l'eau peptonée à 1 g/l. Les échantillons ont ensuite été soumis, à l'aide de l'appareil Spiral décrit par Gilchrist *et al.* (1973), au dénombrement :

- de la «flore totale» sur milieu salé au lactate additionné de 5 g/l de carbonate de calcium. Sa composition est la suivante (Piton, 1988) : tryptone, 10 g/l; extrait de levure, 5 g/l; lactate de sodium, 5 g/l; chlorure de sodium, 30 g/l; gélose, 15 g/l;

- de la flore bactérienne halotolérante sur le milieu Mannitol Salt Agar (Difco) additionné de 20 mg/l d'amphotéricine B (Fungizone) pour inhiber la croissance des levures et des moisissures et de 5 g/l de carbonate de calcium;

- de la flore à Gram négatif, après 48 h d'incubation à 30 °C, sur milieu Nutrient Agar * additionné de 2 mg/l de cristal violet et de 20 mg/l d'amphotéricine B pour inhiber respectivement la croissance de la flore à Gram positif et celle des levures;

- des levures sur milieu Yeast Extract Dextrose Chloramphénicol après 72 h d'incubation à 30 °C (Anonyme, 1980).

Pour la flore totale et la flore halotolérante, les boîtes ont été incubées en aérobiose à 27-28 °C pendant 3 j puis à température ambiante pendant 2-3 semaines afin de permettre un développement maximal des colonies et de leur pigmentation. On effectuait alors une numération séparée des différents types de colonies se différenciant par l'aspect (pigmentation et opacité). Les principaux types se sont révélés être les mêmes que ceux observés par Piton (1988). On a pu différencier les types A (orange opaque), B (non pigmenté opaque), C (jaune opaque) et D (non pigmenté translucide). Cependant, comme

* Institut Pasteur Production

il était souvent très difficile de distinguer les colonies opaques des colonies translucides sur le milieu salé au lactate, nous les avons regroupées sous le terme de «colonies non pigmentées» (types B et D). Cette différenciation des groupes pigmentaires peut présenter un intérêt technologique : en effet, la couleur de la croûte est un critère de qualité des fromages et on peut penser que des variations dans les proportions de ces différents groupes peuvent engendrer des variations de pigmentation de la croûte.

Caractérisation primaire de la flore bactérienne halotolérante

Pour chaque échantillon de morge analysé, on a prélevé sur le milieu MSA tamponné, 20 colonies appartenant aux types morphologiques et pigmentaires A, B et D : 8 colonies orange opaques (type A) et 16 colonies non pigmentées (types B et D). Les colonies jaunes opaques (type C) ont été prélevées sur le milieu salé au lactate (4/boîte) car les nombres de colonies jaunes opaques étaient significativement plus élevés sur ce milieu que sur MSA tamponné (voir résultats). Toutes ces colonies ont été purifiées au minimum à 2 reprises selon la technique rapide décrite par Richard (1981).

On a effectué ensuite des suspensions des souches purifiées dans les alvéoles d'une boîte de Petri carrée à 25 compartiments contenant 2,5 ml d'un bouillon BHI stérile. Cette boîte servait à ensemercer différents milieux répartis en boîtes de Petri de 140 mm de diamètre à l'aide d'un inoculateur Multipoint. Les tests suivants ont été réalisés :

- morphologie et mobilité des cellules dans le bouillon BHI sur culture jeune (24-48 h) et sur culture âgée (1 semaine) de façon à mettre en évidence un éventuel changement (Mulder et Antheunisse, 1963). Nous avons utilisé une variante rapide de la technique des gouttes pendantes (Lowis, 1969), qui consiste à déposer une goutte de culture de 4 souches différentes sur une lamelle microscopique de 24 x 60 mm; la lamelle est retournée et placée sur un support rigide et l'examen est fait en série, à l'aide d'un microscope à contraste de phase muni d'un objectif à immersion;

- réaction de Gram, en présence d'une solution de potasse : un fragment de colonie est mélangé à une goutte de potasse à 3%. La formation d'un gel en 5-20 s (micro-organismes KOH positifs) correspond à une réaction Gram négative (Bück, 1982);

- culture en présence d'acide nalidixique (40 mg/l) et de pénicilline G (100 UI/ml) sur milieu de Mueller-Hinton *;

- culture sur milieu MSA additionné de carbonate de calcium (5 g/l) pour confirmation de croissance et mise en évidence de la pigmentation et d'une acidification éventuelle;

- mise en évidence d'une catalase.

Les micro-organismes ont été classés en différents groupes sur la base de ces tests. Les bactéries sous forme de cocci en culture jeune, KOH négatives, catalase positives ont été rangées dans les *Micrococcaceae*. Les bâtonnets KOH négatifs de forme irrégulière groupés en caractères chinois, en palissades ou formant des V caractéristiques ont été classés comme bactéries corynéformes (Mulder et Antheunisse, 1963; Crombach, 1974; Rogosa *et al.*, 1974); beaucoup d'entre eux évoluaient vers des formes coccoïdes après une semaine de culture.

Détermination du pH

Le pH de la morge a été déterminé sur une partie de l'échantillon moyen obtenu par grattage. L'électrode était placée en contact avec l'échantillon tassé dans un godet. Après environ 2-3 min, l'équilibre était atteint et la mesure de pH effectuée.

Détermination de l'activité de l'eau

La mesure de l'activité de l'eau a été effectuée au moyen de la méthode par interpolation de Landrock et Proctor (1951). Les «languettes» de croûte ont été placées sur une lame de verre à environ 0,5 cm de solutions saturées de dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$), de phosphate monopotassique (K_2HPO_4) et de nitrate de po-

* Institut Pasteur Production

tassium (KNO_3) contenues dans des récipients étanches. On obtenait ainsi, à une température de 20 °C, des atmosphères à respectivement 98, 96,5 et 93,5% d'humidité relative (Winston et Bates, 1960); les solutions saturées ont été préparées comme le préconisaient ces auteurs. Le changement de poids était déterminé après 24 h. Une analyse de régression permettait ensuite de calculer l'activité de l'eau de la croûte, c'est-à-dire l'humidité relative pour laquelle la variation de poids serait nulle. Compte-tenu du poids très faible des échantillons, 3 mesures ont été effectuées pour chaque fromage et pour chaque solution de façon à améliorer la précision de la mesure : dans ces conditions, l'écart type de répétabilité de l'activité de l'eau était de 0,34% d'HR (humidité relative) ce qui correspondait à un écart type relatif de 0,35%.

RÉSULTATS

Composition moyenne et variabilité de la morge du Comté et du Beaufort

Pour la morge du Comté, les niveaux de la «flore totale» (somme des 3 groupes pigmentaires sur milieu salé au lactate) sont en moyenne de $1,6 \cdot 10^9$ UFC/cm² de croûte après 15 j d'affinage, mais avec de grandes variations entre prélèvements : entre $6,3 \cdot 10^7$ et $1,4 \cdot 10^{10}$ /cm² (tableau I). Après 2 ou 4 mois d'affinage, ces niveaux augmentent et atteignent en moyenne $8,1 \cdot 10^9$ /cm² mais avec une variabilité entre prélèvements plus faible qu'en début d'affinage. Les niveaux observés en Beaufort (tableau II) sont en moyenne légèrement plus élevés qu'en Comté aux 2 stades de l'affinage et en début d'affinage, ils présentent une variabilité beaucoup plus faible qu'en Comté. Comme pour la «flore totale», les niveaux de chaque groupe pigmentaire sur milieu salé au lactate ou sur MSA tamponné augmentent au cours de l'affinage et sont en moyenne plus élevés en Beaufort.

Dans le cas des bactéries non pigmentées et orange, les nombres obtenus sur les 2 milieux utilisés dans cette étude ne sont pas en moyenne significativement différents à $P = 0,05$, même en début d'affinage. Nous avons donc calculé la moyenne des nombres obtenus sur ces 2 milieux afin d'obtenir une meilleure estimation des niveaux atteints par ces 2 groupes pigmentaires dans la morge. Par contre, pour les colonies jaunes, la différence entre les nombres obtenus sur les 2 milieux est significative (à $P < 0,05$) aux 2 stades d'analyse: ils sont supérieurs sur milieu salé au lactate à ceux obtenus sur MSA tamponné dans un rapport pouvant atteindre 1–4. La caractérisation primaire des souches jaunes sur milieu au lactate en apporte l'explication (voir paragraphe suivant : caractérisation primaire de la flore bactérienne halotolérante).

D'autre part, on observe en Comté et en Beaufort, une prédominance des colonies non pigmentées par rapport aux colonies orange, tandis que les colonies jaunes restent nettement sous-dominantes. Ces rapports entre groupes pigmentaires semblent cependant varier légèrement en fonction du type de fromage puisque sur milieu au lactate, on constate une proportion de colonies jaunes légèrement plus forte en Beaufort (environ 9% contre moins de 5% en Comté).

Le Beaufort se caractérise nettement par l'absence de micro-organismes à Gram négatif ($< 10^4$ /cm² aux 2 stades de l'analyse). En Comté par contre, on les rencontre à des niveaux parfois élevés et très variables d'un prélèvement à l'autre : entre 10^4 et plus de 10^7 /cm², après 15 j d'affinage. À l'inverse des autres groupes de micro-organismes, la population en levures semble décroître au cours de l'affinage (en moyenne, d'un facteur 10), à la fois en Comté et en Beaufort et la variabilité du niveau de ces micro-organismes dans la morge du Comté est plus forte en fin qu'en début d'affinage.

Tableau I. Résultats des numérations effectuées sur la morge des fromages de Comté aux 2 stades d'affinage. Statistiques élémentaires.

Levels of the main microbial groups, pH and water activity of the Comté cheese smear at 2 stages of cheese ripening.

Variable	Stade	Moyennes et écarts types ^a		Min ^b	Max ^b
Flore à Gram négatif	1	5,13 ± 1,31	1,35.10 ⁵	3,38	7,48
	2	6,89 ± 0,93	7,76.10 ⁶	5,40	8,34
Levures	1	7,56 ± 0,56	3,62.10 ⁷	6,18	8,38
	2	6,44 ± 0,72	2,75.10 ⁶	5,20	7,54
Non pigmentées sur L ₃	1	9,01 ± 0,51	1,02.10 ⁹	7,38	9,68
	2	9,73 ± 0,29	5,37.10 ⁹	9,18	10,44
Jaunes sur L ₃	1	7,88 ± 0,56	7,59.10 ⁷	6,88	8,86
	2	8,56 ± 0,39	3,63.10 ⁸	7,86	9,11
Orange sur L ₃	1	8,72 ± 0,60	5,25.10 ⁸	7,49	9,92
	2	9,38 ± 0,42	2,40.10 ⁹	8,46	10,27
Non pigmentées sur MSA	1	8,88 ± 0,56	7,59.10 ⁸	7,28	9,66
	2	9,55 ± 0,23	3,55.10 ⁹	9,08	9,86
Jaunes sur MSA	1	7,30 ± 0,59	2,00.10 ⁷	6,11	8,34
	2	8,14 ± 0,29	1,38.10 ⁸	7,66	8,79
Orange sur MSA	1	8,81 ± 0,51	6,46.10 ⁸	7,51	9,54
	2	9,25 ± 0,42	1,78.10 ⁹	8,20	9,76
Aw (en %)	1	96,17 ± 1,11		94,26	98,49
	2	95,88 ± 1,34		92,84	98,46
pH	1	7,29 ± 0,57		5,40	7,76
	2	7,51 ± 0,45		6,78	8,86

^a Moyenne et écart type des nombres d'UFC/cm² de croûte (en log), et moyenne géométrique en UFC/cm² (en log).

^b Valeurs minimum et maximum des résultats de dénombrements en log UFC/cm². Flore à Gram négatif : flore dénombrée sur milieu NA additionné de cristal violet. Non pigmentées, orange et jaune sur L₃ et MSA : niveaux des différents groupes pigmentaires dénombrés respectivement sur milieu salé au lactate (L₃) ou sur MSA tamponné.

^a Mean and standard deviation of the numbers of CFU/cm² (in log) and geometric mean in CFU/cm². ^b Minimum and maximum values of the numbers of CFU/cm² (in log).

Caractérisation primaire de la flore bactérienne halotolérante

Le tableau III présente les résultats de la caractérisation primaire des 423 souches orange opaques et des 602 souches non

pigmentées isolées sur milieu MSA tamponné. On observe tout d'abord que la proportion des souches opaques parmi la flore non pigmentée est nettement plus importante que celle des souches translucides puisqu'elles représentent près de

Tableau II. Résultats des numérations effectuées sur la morge des fromages de Beaufort aux 2 stades d'affinage. Statistiques élémentaires.

Levels of the main microbial groups, pH and water activity of the Beaufort smear at 2 stages of cheese ripening.

Variable	Stade	Moyennes et écarts types ^a		Min ^b	Max ^b
Flore à Gram négatif	1	2,04 ± 0,39	110	1,32	2,46
	2	2,80 ± 0,84	630	1,68	3,80
Levures	1	7,23 ± 0,61	1,70.10 ⁷	5,92	7,96
	2	6,07 ± 0,97	1,17.10 ⁶	4,98	7,67
Non pigmentées sur L ₃	1	9,50 ± 0,12	3,16.10 ⁹	9,21	9,61
	2	9,91 ± 0,34	8,13.10 ⁹	9,62	10,43
Jaunes sur L ₃	1	8,54 ± 0,13	3,47.10 ⁸	8,26	8,68
	2	9,05 ± 0,36	1,12.10 ⁹	8,56	9,60
Orange sur L ₃	1	9,07 ± 0,06	1,17.10 ⁹	8,99	9,15
	2	9,65 ± 0,37	4,47.10 ⁹	9,20	10,36
Non pigmentées sur MSA	1	9,53 ± 0,36	3,39.10 ⁹	9,01	10,15
	2	9,70 ± 0,14	5,01.10 ⁹	9,48	9,90
Jaunes sur MSA	1	7,97 ± 0,32	9,33.10 ⁷	7,61	8,38
	2	8,32 ± 0,17	2,09.10 ⁸	8,08	8,60
Orange sur MSA	1	9,10 ± 0,10	1,26.10 ⁹	8,93	9,23
	2	9,63 ± 0,26	4,27.10 ⁹	9,34	10,15
Aw (en %)	1	96,70 ± 0,88		95,77	98,25
	2	95,36 ± 0,90		93,99	96,51
pH	1	7,60 ± 0,18		7,28	7,93
	2	7,68 ± 0,20		7,23	7,87

a, b: voir tableau I

a, b: voir table I

80% des souches isolées. D'autre part, quel que soit le groupe pigmentaire, les souches appartiennent principalement à 2 grands groupes bactériens : les bactéries corynéformes et les *Micrococcaceae*. Ces dernières ont été trouvées à des fréquences plus grandes parmi les souches

non pigmentées et leur proportion diminue nettement au cours de l'affinage des fromages. D'autres groupes de microorganismes ont également été mis en évidence parmi la flore non pigmentée translucide; ces souches correspondent généralement à des cocci ou des coccobacilles à

Tableau III. Caractérisation primaire des souches orange opaque et non pigmentées isolées sur milieu Mannitol Salt Agar tamponné aux deux stades de l'affinage des fromages.
Primary characterization of orange pigmented and non-pigmented strains isolated on buffered MSA from Comté and Beaufort smear at 2 stages of the cheese ripening period.

Groupe pigmentaire	Stade	N	Microcoques	Bactéries corynéformes	Autres
Orange opaque	1	211	3,8*	96,2	0
	2	212	0,9	99,1	0
Non pigmentées opaques	1	247	29,1	70,9	0
	2	217	15,2	84,3	0,5
Non pigmentées translucides	1	56	12,5	73,2	14,3
	2	82	7,3	87,8	4,9
Total		1 025	12,5	86,2	1,3

N : nombre de souches. * : Pourcentage par rapport au nombre total de souches appartenant au groupe pigmentaire et isolées à chaque stade.

*N : number of strains; * percentage from the total number of strains belonging to the pigmented bacterial group and isolated at each stage of cheese ripening.*

réaction Gram-négative mais compte tenu de leur faible fréquence, nous n'avons pas poursuivi leur caractérisation.

En début d'affinage, la proportion de microcoques parmi la flore non pigmentée opaque semble assez fortement influencée par l'origine des fromages, puisque ce groupe bactérien représente, selon le prélèvement, entre 0 et 90% des souches isolées. D'autre part, nous avons noté un effet saison sur la nature de la flore orange opaque, puisque les microcoques orange ont été isolés uniquement sur les fromages fabriqués en hiver.

Sur le tableau IV, nous avons présenté les résultats de la caractérisation primaire des souches jaunes opaques prélevées sur milieu salé au lactate. Sur les 208 souches prélevées, 4 d'entre elles ne sont pas capables de croître sur milieu MSA tamponné (soit moins de 2%) tandis que les 204 autres souches donnent des colo-

nies de 3 pigmentations différentes sur milieu MSA, soit orange, non pigmentées ou jaunes. Le pourcentage de souches donnant des colonies jaunes opaques sur MSA est en moyenne assez faible (36%) et il est très variable d'un lot de fromages à l'autre : selon le prélèvement, 0 à 100% des 4 souches isolées sur milieu au lactate donnent également des colonies jaunes sur milieu MSA. Comme pour la flore orange ou non pigmentée prélevée sur milieu MSA, la flore jaune isolée sur milieu salé au lactate est composée essentiellement de bactéries corynéformes et de microcoques, mais la proportion de microcoques est alors nettement plus importante. Un facteur saison de fabrication a pu être observé puisque les colonies orange ont été isolées uniquement sur les fromages d'hiver. D'autre part, la proportion de colonies jaunes est plus importante en été, surtout en fin d'affinage des fromages. En

Tableau IV. Caractérisation primaire des souches jaunes opaques isolées sur milieu salé au lactate. *Primary characterization of yellow pigmented strains isolated on salted lactate medium from Comté and Beaufort smear.*

<i>Pigmentation sur milieu MSA tamponné</i>	<i>N</i>	<i>Microcoques</i>	<i>Bactéries corynéformes,</i>	<i>Autres</i>
Orange opaque	45	81,8*	17,8	0,4
Jaune opaque	76	68,4	21,1	10,5
Non pigmentées	83	53,0	45,8	0,2
Total	204	64,2	30,4	5,4

N : nombre de souches. * Pourcentage par rapport au nombre total de souches appartenant à chaque groupe pigmentaire.

*N: number of strains; * percentage from the total number of strains belonging to each pigmented bacterial group.*

effet, cette proportion est, en début d'affinage, de 38,5% en été contre 28,8% en hiver; en fin d'affinage, ces proportions sont respectivement de 65,4 et de 19,2%.

Relation entre groupes de micro-organismes

En début d'affinage, il existe une corrélation hautement significative entre les différents groupes pigmentaires (tableau Va), à l'exception des colonies jaunes sur MSA tamponné dont les niveaux ne sont pas reliés à ceux des orange ou des non pigmentées, ni même avec les niveaux de bactéries jaunes opaques dénombrées sur le milieu «flore totale». Cette relation très étroite entre groupes pigmentaires en début d'affinage semble diminuer au cours de l'affinage (tableau Vb). D'autre part, il ne semble pas exister de relation entre les niveaux de levures et ceux des autres groupes de micro-organismes. À l'inverse, tout au long de l'affinage, nous avons mis en évidence une corrélation négative significative entre le niveau de la flore jaune

opaque sur MSA tamponné et celui de la flore à Gram négatif. La figure 1 montre que cette corrélation élevée provient de 2 phénomènes : d'une part, l'opposition entre les 2 types de fromages étudiés, le Beaufort se caractérisant par l'absence de micro-organismes à Gram négatif et des niveaux en moyenne plus élevés de colonies jaunes opaques. D'autre part, si pour le Beaufort, il n'existe aucune relation entre les niveaux de ces 2 groupes bactériens en début d'affinage, la relation semble à l'inverse assez nette pour les fromages de Comté : le coefficient de corrélation est alors de $-0,811$.

Il est intéressant de noter l'absence de corrélation entre le niveau de la population en levures et le pH de la morge, même en début d'affinage des fromages. Par contre, il existe des corrélations hautement significatives entre le pH et les niveaux des groupes pigmentaires constituant la «flore totale» en début d'affinage des fromages.

Afin de visualiser toutes les relations entre variables, nous avons effectué, pour chaque stade, une analyse en composantes principales regroupant les résultats

Tableau V. Corrélations entre groupes de micro-organismes, pH et activité de l'eau de la morge du Comté et du Beaufort en début d'affinage ^a et en fin d'affinage ^b.
Correlations between the levels of the main microbial groups, pH and water activity of Comté and Beaufort cheese smear. ^a At the beginning of cheese ripening. ^b At the end of cheese ripening.

Variable	GN	Lev	NP	O	J/L ₃	J/MSA	Aw
^a <i>Stade 1 (N = 26)</i>							
Gram négatif (GN)	1,000						
Levures (Lev)	–	1,000					
Non pigmentées (NP)	–	–	1,000				
Orange opaque (O)	–	–	0,836	1,000			
Jaunes sur milieu au lactate (J/L ₃)	–	–	0,593	0,714	1,000		
Jaunes sur milieu MSA (J/MSA)	–0,581	–	–	–	–	1,000	
Aw	–	–	–	–	–	–	1,000
pH	–	–	0,787	0,588	0,397	–	–
^b <i>Stade 2 (N = 26)</i>							
Gram négatif (GN)	1,000						
Levures (Lev)	–	1,000					
Non pigmentées (NP)	–	–	1,000				
Orange opaque (O)	–	–	–	1,000			
Jaunes sur milieu au lactate (J/L ₃)	–0,413	0,408	0,396	0,604	1,000		
Jaunes sur milieu MSA (J/MSA)	–0,495	–	–	0,446	–	1,000	
Aw	–	–	–	–	–	–	1,000
pH	–	–	–	–	–	–	–

(–) Non significatif au seuil de 5%.

(–) Non significant at a 5% threshold level.

obtenus dans chaque fromagerie (13 fromageries x 2 saisons). Les plans principaux (1–2) de l'analyse qui absorbent respectivement 60,7% et 52,7% de l'inertie du système pour le stade 1 et le stade 2, sont ceux qui donnent la meilleure image de ces relations (fig 2a, b). Cette approche multivariable confirme naturellement les observations précédentes faites à partir de la matrice des corrélations entre variables prises deux à deux (tableau V). C'est le

cas, par exemple aux 2 stades de l'affinage, de l'opposition entre les niveaux de la flore à Gram négatif et ceux de la flore jaune opaque sur milieu MSA tamponné, ou de la forte corrélation entre les niveaux de la flore jaune opaque sur milieu L₃ et de la flore orange. Mais elle permet également de mettre en évidence, en début d'affinage, une relation entre l'activité de l'eau de la morge et le niveau de la flore jaune opaque sur MSA tamponné ou de la flore à

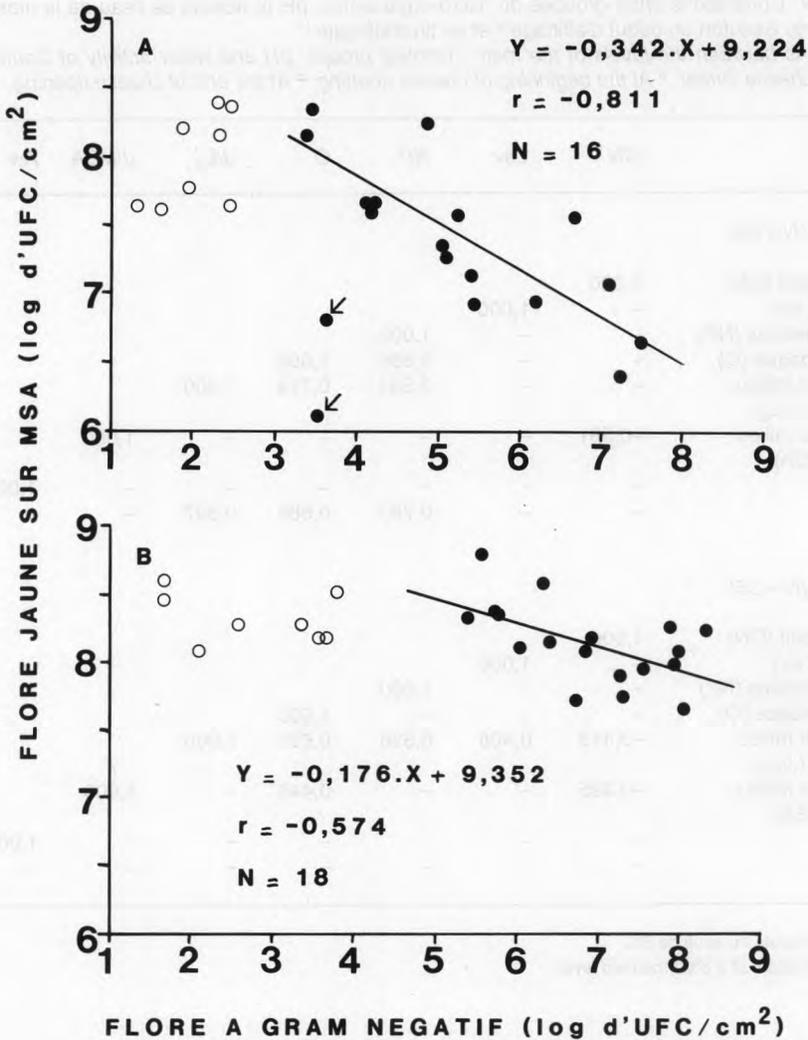


Fig 1. Relation entre les logarithmes décimaux des nombres de micro-organismes à Gram négatif (en abscisses) et des nombres de colonies jaunes opaques dénombrées sur milieu MSA tamponné (en ordonnées) de la morge du Comté (●) et du Beaufort (O) (en UFC/cm² de croûte). (A) Début d'affinage; (B) Fin d'affinage; (-----) droites de régression calculées pour la morge du Comté; en début d'affinage, deux échantillons n'ont pas été inclus dans le calcul.

Relationship between the logarithms of the numbers of Gram-negative bacteria (abscissa) and the logarithms of the numbers of yellow-pigmented bacteria on buffered MSA (vertical axis) in Comté (●) and Beaufort (O) smear (in log CFU/cm²). (A) Beginning of the cheese ripening period. (B) End of the cheese ripening period. (-----) Regression lines for the Comté cheese smear; 2 results were excluded at the beginning of the ripening period.

Gram négatif : les corrélations de ces 3 variables avec l'axe 2 sont respectivement de 0,617, -0,870 et 0,703. La relation entre l'activité de l'eau de la morge et le niveau de la flore jaune opaque dénombrée sur MSA tamponné (fig 3) est nettement plus satisfaisante après élimination des résultats obtenus sur la morge du Beaufort : le coefficient de corrélation linéaire entre les 2 variables passe alors de -0,343 (NS) pour l'ensemble des données à -0,668 (significatif à $P < 0,01$) pour les échantillons de morge du Comté. De même, le coefficient de corrélation linéaire entre les niveaux de la flore à Gram négatif et l'activité de l'eau de la croûte passe de 0,068 (NS) à 0,485 (significatif à $P < 0,05$). Par contre, en fin d'affinage, il n'existe plus de corrélation entre l'activité de l'eau de la croûte et le niveau de ces 2 groupes microbiens. À l'inverse, il semble exister une relation entre le niveau de la population en levures et l'activité de l'eau puisque ces variables sont assez fortement corrélées à l'axe 2 : les coefficients de corrélation avec cet axe sont de -0,755 pour les levures et de -0,610 pour l'activité de l'eau. Cette relation entre variables n'est cependant pas significative (tableau Vb).

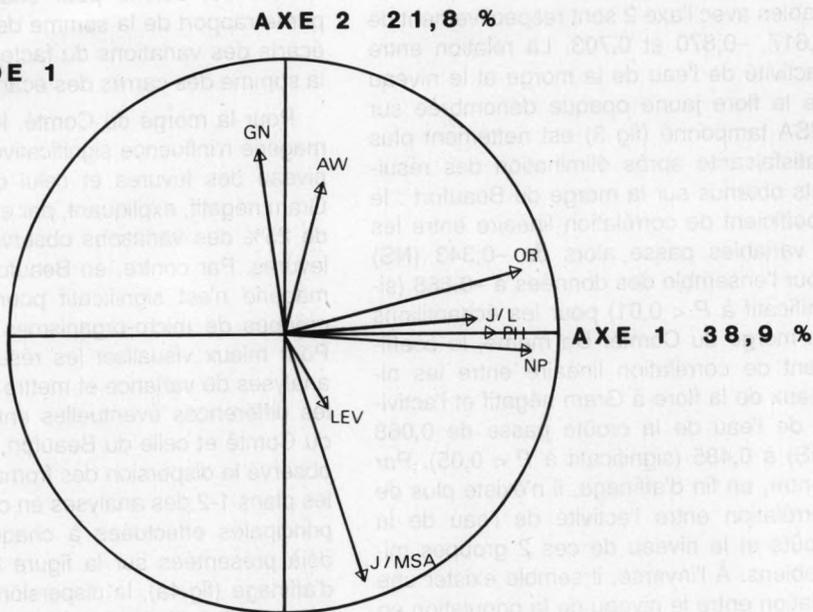
Influence des facteurs

Pour chaque variable, une analyse de variance à 3 voies à modèle croisé (fromagerie, saison et stade) a été effectuée sur les résultats des 36 prélèvements réalisés sur les fromages de Comté ou des 16 prélèvements sur les fromages de Beaufort; pour s'affranchir des différences éventuelles entre les 2 types de fromages, les résultats ont été traités séparément pour la morge du Comté et celle du Beaufort. Les tableaux VI et VII présentent les résultats de ces 2 analyses de variance; le pourcentage de la variance attribuable à chaque

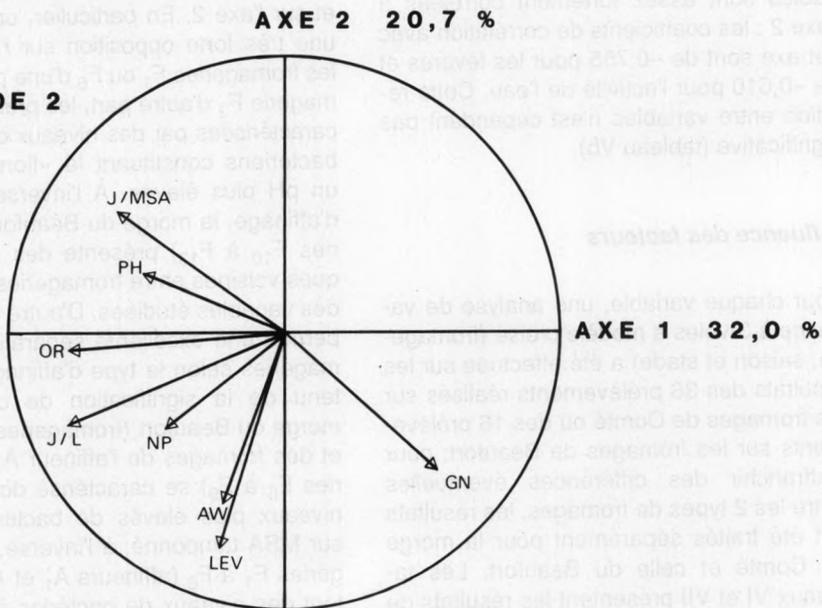
facteur est estimé pour chaque variable par le rapport de la somme des carrés des écarts des variations du facteur étudié sur la somme des carrés des écarts totaux.

Pour la morge du Comté, le facteur fromagerie n'influence significativement que le niveau des levures et celui de la flore à Gram négatif, expliquant, par exemple, près de 25% des variations observées pour les levures. Par contre, en Beaufort, l'effet fromagerie n'est significatif pour aucun des groupes de micro-organismes dénombrés. Pour mieux visualiser les résultats de ces analyses de variance et mettre en évidence les différences éventuelles entre la morge du Comté et celle du Beaufort, nous avons observé la dispersion des fromageries dans les plans 1-2 des analyses en composantes principales effectuées à chaque stade et déjà présentées sur la figure 2. En début d'affinage (fig 4a), la dispersion des fromageries à Comté dans le plan de cette analyse est très importante, à la fois sur l'axe 1 et sur l'axe 2. En particulier, on peut noter une très forte opposition sur l'axe 1 entre les fromageries F_1 ou F_6 d'une part et la fromagerie F_3 d'autre part, les premières étant caractérisées par des niveaux des groupes bactériens constituant la «flore totale» et un pH plus élevés. À l'inverse, en début d'affinage, la morge du Beaufort (fromageries F_{10} à F_{13}) présente des caractéristiques voisines entre fromageries sur le plan des variables étudiées. D'autre part, l'axe 2 permet une excellente séparation des fromageries selon le type d'affinage. Compte tenu de la signification de cet axe, la morge du Beaufort (fromageries F_{10} à F_{13}) et des fromages de l'affineur A_3 (fromageries F_6 à F_9) se caractérise donc par des niveaux plus élevés de bactéries jaunes sur MSA tamponné; à l'inverse, les fromageries F_1 à F_6 (affineurs A_1 et A_2) présentent des niveaux de bactéries à Gram négatif et une activité de l'eau généralement plus élevés.

(a) STADE 1



(b) STADE 2



En fin d'affinage (fig 4b), on peut également observer une assez grande dispersion des fromageries dans le plan 1-2 de l'analyse. Comme en début d'affinage, la morge du Beaufort se distingue assez nettement de celle du Comté, mais on note cependant une plus grande variabilité de la composition de sa flore qu'en début d'affinage : en particulier, les fromageries F_{10} et F_{11} semblent avoir respectivement des niveaux de colonies orange ou jaunes opaques plus élevés. D'autre part, une opposition assez nette peut être mise en évidence entre les fromageries à fort niveau en bactéries jaunes sur MSA tamponné (fromageries à Beaufort, fromagerie F_8) et celles à fort niveau en bactéries à Gram négatif (fromageries de l'affineur A_2 et fromagerie F_3 , par exemple).

Le facteur saison de fabrication est significatif pour un nombre assez important des variables de l'analyse (tableaux VI et VII). En particulier, il influence de façon très hautement significative les niveaux de la flore à Gram négatif de la morge du Comté, en expliquant 21,3% des variations observées. Les nombres sont en moyenne plus élevés sur les fromages d'hiver mais la différence entre saisons est nettement plus importante en début d'affinage des

fromages. De même, on peut noter des populations de levures en nombres plus élevés sur les Comtés d'été mais dans ce cas, les différences entre saisons sont nettement plus importantes en fin d'affinage. Pour la flore halotolérante de la morge du Comté (tableau VI), l'effet saison n'est significatif que pour le niveau des orange opaques et il explique alors une faible proportion des variations observées (8,7%) : ainsi, les niveaux observés sont en moyenne de $1,6 \cdot 10^9/\text{cm}^2$ en hiver contre $7,6 \cdot 10^8$ en été.

Les observations sont un peu différentes dans le cas de la morge du Beaufort (tableau VII). En particulier, on peut noter une interaction significative importante entre la saison de fabrication et le stade d'affinage pour les bactéries jaunes opaques. Cependant, le comportement de cette flore varie en fonction du milieu de dénombrement : la différence entre saisons est plus importante en fin d'affinage pour la flore dénombrée sur milieu salé au lactate; c'est l'inverse pour celle dénombrée sur milieu MSA tamponné. Ces observations sont bien sûr liées au fait que la flore dénombrée sur milieu MSA ne constitue qu'une petite fraction de celle dénombrée sur milieu au lactate.

Fig 2. Cercle des corrélations dans le plan principal de l'analyse en composantes principales des résultats de numération, pH et activité de l'eau dans la morge des fromages de Comté et du Beaufort. (a) Début d'affinage; (b) fin d'affinage. GN : flore à Gram négatif dénombrée sur milieu NA additionné de cristal violet; NP, OR : flore non pigmentée et orange (moyenne des 2 résultats de numération sur milieu au lactate et sur MSA tamponné); J/L et J/MSA : flore jaune opaque dénombrée sur milieu salé au lactate (L) ou sur milieu MSA tamponné; Aw : activité de l'eau de la croûte; LEV : levures; pH : pH de la croûte.

Circle of correlations in the principal plane of the principal components analysis of the levels of the microbial flora, pH and water activity in the Comté and Beaufort cheese smear. (a) Beginning of the cheese ripening period. (b) End of the cheese ripening period. GN : Gram-negative flora counted on nutrient agar supplemented with crystal violet; NP, OR: non-pigmented and orange-pigmented flora (mean of the numbers of CFU/cm² obtained on buffered MSA and salted lactate medium). J/L and J/MSA: yellow pigmented flora counted on salted lactate medium (L) and buffered MSA. Aw, pH: water activity and pH of the smear. LEV: yeasts.

FLORE JAUNE SUR MSA (log d'UFC/cm²)

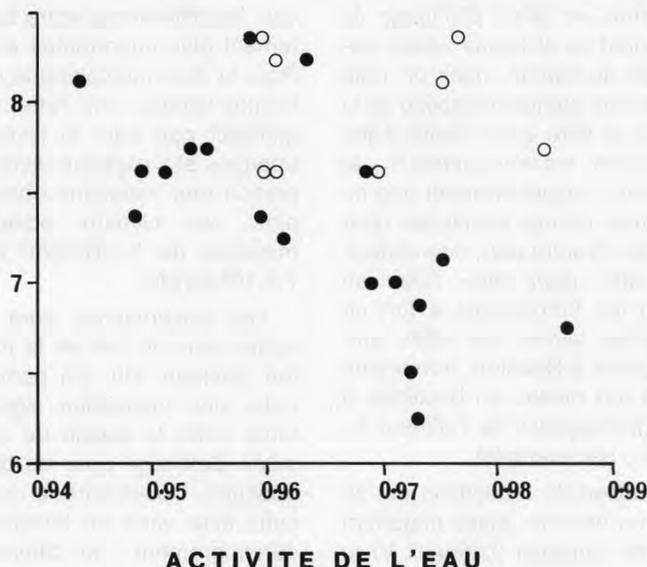


Fig 3. Relation entre l'activité de l'eau de la croûte en début d'affinage et le niveau de la flore jaune opaque dénombrée sur MSA tamponné (en log UFC/cm²) dans la morge du Comté (●) et du Beaufort (○).

Relationship between smear water activity and the levels of the yellow-pigmented flora enumerated on buffered MSA (in log CFU/cm²) in Comté (●) and Beaufort (○) cheese smear at the beginning of the ripening period.

DISCUSSION

Notre étude confirme par un échantillonnage beaucoup plus large, les observations faites par Accolas *et al* (1978) et Piton (1988) sur le Comté et le Beaufort ou par Blanc *et al* (1983) sur le Gruyère suisse, à savoir une implantation rapide de la flore microbienne à la surface des fromages de Comté et de Beaufort, et à des niveaux très élevés. En moyenne de $1,6 \cdot 10^9$ cellules/cm² de croûte après 15 j d'affinage, ces niveaux atteignent par

exemple près de 10^{10} cellules/cm² à la surface des fromages de Comté en fin d'affinage. La variabilité assez grande de ces niveaux en début d'affinage (entre $6,3 \cdot 10^7$ et plus de 10^{10} /cm²) avait déjà été notée dans des proportions semblables par Piton (1988) et celle-ci est liée aux variations de la vitesse d'implantation de la flore en fonction des caractéristiques physico-chimiques des fromages et/ou des conditions d'affinage. Par contre, lorsque la flore microbienne s'est stabilisée à son niveau maximal, les divergences quantitatives

Tableau VI. Résultats de l'analyse de variance à 3 voies des résultats des numérations effectuées sur la morge des fromages de Comté.*Influence of the cheese plant, the season and the ripening stage on the levels of the main microbial groups of Comté cheese smear. Results of a 3-way analysis of variance.*

Variable	Facteur fromagerie (F)	Facteur saison (Sa)	Facteur stade (St)	F x S ^a	F x Sa ^b	Sa x St ^c
Flore à Gram –	* d 14,5% ^e	*** 21,3%	*** 37,6%	NS	* 12,6%	* 3,2%
Levures	** 24,9%	** 11,3%	*** 43,0%	NS	NS	* 2,9%
Non pigmentées	NS	NS	*** 42,4%	NS	NS	NS
Orange opaque	NS	* 8,7%	*** 25,0%	NS	NS	NS
Jaunes sur L ₃	NS	NS	** 33,3%	NS	NS	NS
Jaunes sur MSA	NS	NS	*** 44,8%	NS	NS	NS
Aw	NS	NS	NS	NS	NS	* 2,1%
pH	NS	* 16,2%	NS	NS	NS	NS

^a Interaction Fromagerie x Saison. ^b Interaction Fromagerie x Stade. ^c Interaction Saison x Stade. ^d NS : non significatif; *, ** et *** : effet significatif au seuil de 5, 1 et 0,1% respectivement. ^e Pourcentage de la variance expliqué par le facteur. Flore à Gram – : flore dénombrée sur milieu NA additionné de cristal violet. Non pigment, orange opaque et jaunes : niveaux des différents groupes pigmentaires dénombrés sur milieu salé au lactate (L₃) ou sur MSA.

^a Interaction cheese plant x season. ^b Interaction cheese plant x ripening stage. ^c Interaction season x ripening stage. ^d Significance levels: NS: non-significant; *, **, *** significant respectively at the 5, 1 and 0.1% levels. ^e Percentage of variance explained by the factor.

entre lots de fromages sont relativement faibles (environ 1 unité de log entre les extrêmes).

La flore bactérienne de la morge des fromages de Comté et de Beaufort est constituée de 3 grands groupes pigmentaires, conformément à ce qui a été obser-

vé dans l'étude de Piton (1988). L'examen de plus d'un millier de souches isolées dans 13 fromageries nous a par ailleurs permis de confirmer sur une base statistique solide, la plupart des résultats déjà acquis sur la nature de cette flore. Quel que soit le groupe pigmentaire, la flore est

Tableau VII. Résultats de l'analyse de variance à 3 voies des résultats des numérations effectuées sur la morge des fromages de Beaufort.

Influence of the cheese plant, the season and the ripening stage on the levels of the main microbial groups of Beaufort cheese smear. Results of a 3-way analysis of variance.

Variable	Facteur fromagerie (F)	Facteur saison (Sa)	Facteur stade (St)	F x S ^a	F x Sa ^b	Sa x St ^c
Levures	NS ^d	NS	* 33,6% ^e	NS	NS	NS
Non pigmentées	NS	* 33,6%	* 30,1%	NS	NS	NS
Orange opaque	NS	NS	** 62,4%	NS	NS	NS
Jaunes sur L3	NS	* 10,0%	** 46,6%	NS	NS	* 11,3%
Jaunes sur MSA	NS	NS	* 32,7%	NS	NS	* 34,6%
Aw	NS	NS	NS	NS	NS	NS
pH	NS	*	NS	NS	NS	NS

a, b, c, d, e : voir tableau VI

a, b, c, d, e : see tableau VI.

composée essentiellement de 2 grands groupes de micro-organismes : les bactéries corynéformes et les *Micrococcaceae*; hormis pour la flore jaune, les bactéries corynéformes constituent la flore dominante et l'importance des *Micrococcaceae* décroît au cours de l'affinage. Quelques divergences apparaissent cependant. C'est le cas en particulier de la fréquence des microcoques non pigmentés qui est nettement plus élevée dans cette étude, surtout en fin d'affinage des fromages. Le choix des fromageries en est probablement la raison principale car nous avons toujours observé de grandes variations de la fré-

quence de ces micro-organismes entre fromageries.

Avec, en moyenne, environ 65% de souches non pigmentées, 30% de souches orange et 5% de souches jaunes à chaque stade d'affinage, nous retrouvons, à la surface du Comté, sensiblement les mêmes équilibres entre flores que ceux déjà notés par Piton (1988) sur un nombre plus limité d'échantillons et de fromageries. Par contre, il est intéressant de constater une proportion de colonies jaunes opaques plus importante à la surface du Beaufort, où cette proportion atteint près de 10%. À l'intérieur de la flore totale, les relations

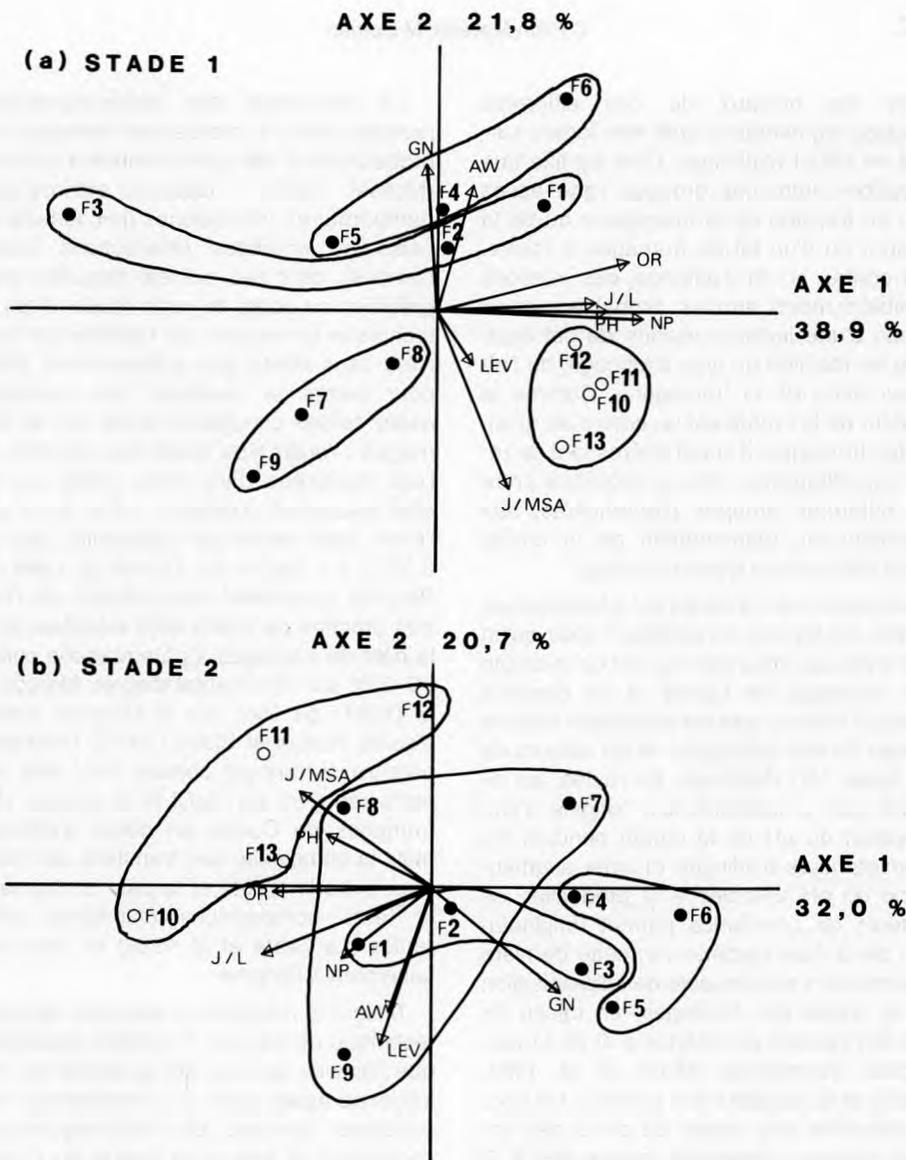


Fig 4. Représentation des fromageries dans le plan principal de l'analyse en composantes principales des résultats de numération, pH et activité de l'eau de la morge du Comté (●) et du Beaufort (○). (a) Début d'affinage; (b) fin d'affinage. GN : flore à Gram négatif dénombrée sur milieu NA additionné de cristal violet; NP, OR : flore non pigmentée et orange (moyenne des 2 résultats de numération sur milieu au lactate et sur MSA tamponné); J/L et J/MSA : flore jaune opaque dénombrée sur milieu salé au lactate (L) ou sur milieu MSA tamponné; Aw : activité de l'eau de la croûte; LEV : levures; pH : pH de la croûte.

Representation of the cheese plants in the principal plane of the principal component analysis of the levels of microbial flora, pH and water activity in the Comté (●) and Beaufort (○) cheese smear. (a) Beginning of the cheese ripening period. (b) End of the cheese ripening period. GN: Gram-negative flora counted on nutrient agar supplemented with crystal violet; NP, OR: non-pigmented and orange-pigmented flora (mean of the numbers of CFU/cm² obtained on buffered MSA and salted lactate medium); J/L and J/MSA: yellow pigmented flora counted on salted lactate medium (L) and buffered MSA. Aw, pH: water activity and pH of the smear. LEV: yeasts.

entre les niveaux de ces différents groupes pigmentaires sont très fortes, surtout en début d'affinage. Cela signifie que l'équilibre entre ces groupes varie assez peu en fonction de la fromagerie ou de la saison, ou d'un lot de fromages à l'autre. Par contre, en fin d'affinage, ces relations semblent moins étroites, probablement en raison d'une individualisation de cet équilibre en fonction du type d'affinage, de l'affineur et/ou de la fromagerie. Comme la couleur de la croûte est un critère de qualité des fromages, il serait intéressant de relier ces différences liées à l'équilibre entre les différents groupes pigmentaires, aux variations de pigmentation de la croûte entre affineurs ou types d'affinage.

Contrairement à ce qui est généralement admis, les levures ne semblent avoir qu'un rôle limité sur l'élévation du pH de la croûte des fromages de Comté et de Beaufort puisqu'il n'existe aucune corrélation entre le niveau de leur population et les valeurs de pH après 15 j d'affinage. En réalité, les levures sont probablement à l'origine d'une élévation du pH de la croûte pendant les premiers jours d'affinage et cette augmentation du pH associée à la production de facteurs de croissance permet l'implantation de la flore bactérienne; cette dernière devient alors responsable de l'alcalinisation de la croûte des fromages, en raison de son fort pouvoir protéolytique et de la production d'ammoniac (Blanc *et al*, 1983; Dasen *et al*, résultats non publiés). De plus, la remontée très rapide du pH à des valeurs élevées (nettement supérieures à 7) se manifeste déjà après seulement 15 j d'affinage; cette remontée est beaucoup plus lente à l'intérieur du fromage puisque d'après Dasen *et al* (Résultats non publiés), le pH est encore inférieur à 6 au bout de 60 j dans le cm de fromage juste sous croûte et d'après Le Graët *et al* (1986), il est égal à 6 dans la croûte des fromages de Beaufort âgés de 8 mois.

La croissance des micro-organismes présents dans la morge des fromages est probablement liée à de nombreux facteurs (Mossel, 1983) : facteurs extrinsèques (température), intrinsèques (pH, activité de l'eau) ou implicites (interactions microbiennes), dont peu ont été mesurés avec précision au cours de cette étude. Ainsi, la technique de mesure de l'activité de l'eau n'est sans doute pas suffisamment fidèle pour mettre en évidence les variations assez faibles constatées entre lots de fromages : l'écart type relatif des activités de l'eau mesurées dans notre étude est en effet seulement d'environ 1–2% alors que l'écart type relatif de répétabilité est de 0,35%. La croûte du Comté et celle du Beaufort possèdent des activités de l'eau très proches de celles déjà relevées dans la pâte de fromages à pâte pressée cuite : 96–97% sur l'Emmental d'après Marcos *et al* (1981) ou 95% sur le Gruyère suisse d'après Ruegg et Blanc (1977). Cela peut paraître surprenant compte tenu des apports réguliers en NaCl à la surface des fromages de Comté en début d'affinage mais la complexité des transferts de minéraux entre la croûte et la pâte du fromage et leurs compositions chimiques différentes (Le Graët *et al*, 1986) en sont certainement à l'origine.

Malgré le manque de précision de notre technique de mesure, il semble cependant que l'activité de l'eau de la croûte ait une influence assez nette sur l'implantation des principaux groupes de micro-organismes constituant la flore et la morge du Comté et du Beaufort en début d'affinage des fromages. Cela est particulièrement net dans le cas de la flore à Gram négatif et des microcoques qui dominent la flore jaune opaque sur milieu MSA tamponné, car ces 2 groupes de micro-organismes permettent assez bien de différencier les fromages selon le type d'affinage. Ainsi, les fromages de Beaufort se caractérisent par

des niveaux des microcoques jaunes en moyenne plus élevés et par l'absence de bactéries à Gram négatif; à l'inverse, les fromages de Comté affinés chez les affineurs A₁ et A₂ se différencient des autres fromages par des niveaux élevés de bactéries à Gram négatif et des niveaux de microcoques jaunes en moyenne plus faibles. La température d'affinage et l'activité de l'eau de la croûte semblent être 2 facteurs contrôlant la croissance de ces 2 groupes de micro-organismes. On sait, en particulier, que les micro-organismes à Gram négatif sont généralement incapables de croître à des Aw inférieures à 96% et que leur résistance à des Aw faibles est largement diminuée lorsque l'on s'éloigne des températures optimales de croissance (Scott, 1957). Cependant, si ces facteurs semblent jouer un rôle déterminant en début d'affinage des fromages, ils ne sont probablement pas les seuls contrôlant la croissance de ces micro-organismes dans la morge, puisqu'en fin d'affinage, la flore à Gram négatif est capable de s'implanter à des niveaux très élevés sur les fromages de Comté de l'affineur A₃, malgré une température des caves inférieure à 10 °C et une activité de l'eau moyenne inférieure à 96%.

L'étude des facteurs qui gouvernent la croissance des micro-organismes à la surface des fromages emmorgés est assez délicate à réaliser dans les milieux très complexes des caves d'affinage ou des fromageries car beaucoup de facteurs varient simultanément. Cette étude a cependant permis de faire des observations qui demandent à être vérifiées sur modèle expérimental, par exemple à la surface de mini-fromages fabriqués et affinés en conditions assez rigoureuses d'asepsie, et ensemencés avec une ou plusieurs souches connues. Ainsi, plusieurs études seraient intéressantes à effectuer comme l'effet de la température du préaffinage et

de la qualité des soins (fréquence et dose d'ensemencement en micro-organismes) sur l'implantation des micro-organismes, ou l'étude des facteurs qui gouvernent l'équilibre entre les différentes souches (interactions microbiennes, doses d'ensemencement ou vitesses de croissance différentes).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement les fromagers et les affineurs qui ont bien voulu participer à cette étude, de leur avoir permis d'effectuer des prélèvements sur leurs fromages.

Ce travail a reçu le soutien financier de l'Agence nationale de valorisation de la recherche (Contrat ANVAR n° 3532 A 0690).

RÉFÉRENCES

- Accolas JP, Melcion D, Vassal L (1978) Étude de la flore superficielle des fromages de Gruyère et de Beaufort. *20^e Congr Int Lait, Paris*, 773-774
- Anonyme (1980) *Lait et Produits Laitiers. Dénombrement des levures et moisissures (Comptage des colonies à 25 °C)*. Norme provisoire FIL 94
- Blanc B, Bosset JO, Martin B, Jimeno J (1983) Échanges gazeux à la surface du fromage de Gruyère en cours de maturation. *Schweiz Milchforsch Forsch* 12, 30-34
- Buck JD (1982) Non staining (KOH) method for determination of Gram reaction of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 44, 992-993
- Crombach WHJ (1974) Morphology and physiology of coryneform bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 40, 361-376
- Dumont JP, Roger S, Adda J (1975) Mise en évidence d'un composé azoté à hétérocycle responsable d'un défaut d'arôme dans le Gruyère de Comté. *Lait* 55, 479-487
- Dumont JP, Adda J, Rousseaux P (1981) Exemple de variation de l'arôme à l'intérieur d'un même type de fromage : le Comté. *Lebensm Wiss Technol* 14, 198-202

- Gilchrist JE, Campbell JE, Donnelly CB, Peeler JT, Delaney JM (1973) Spiral plate method for bacterial determination. *Appl Microbiol* 25, 244-252
- Landrock AH, Proctor BE (1951) A new graphical interpolation method for obtaining humidity equilibria data, with special reference to its role in food packaging studies. *Food Technol* 5, 332-337
- Le Graet Y, Brulé G, Maubois JL, Oeuvarard G (1986) Répartition et évolution des éléments minéraux au cours de l'affinage des fromages à pâte cuite type Beaufort. *Lait* 66, 391-404
- Lewis MJ (1969) A comparison of methods used to determine motility of strains of Gram negative bacteria isolated from aqueous pharmaceutical preparations. *Lab Pract* 18, 929-932
- Marcos A, Alcalá M, León F, Fernández-Salguero J, Esteban MA (1981) Water activity and chemical composition of cheese. *J Dairy Sci* 64, 622-626
- Meyer J, Casey M, Gruskouniak J (1985) Diffusion des peptidases dans le Gruyère. *Schweiz Milchforsch* 14, 11-15
- Mossel DAA (1983) Essentials and perspectives of the microbial ecology of foods. In: *Food microbiology: advances and prospects* (Roberts TA, Skinner FA, eds) Acad Press, Londres, 1-45
- Mulder EG, Antheunisse J (1963) Morphologie, physiologie et écologie des *Arthrobacter*. *Ann Inst Past* 105, 46-74
- Piton C (1988) Évolution de la flore microbienne de surface du gruyère de Comté au cours de l'affinage. *Lait* 68, 419-434
- Piton C, Fontanier C (1990) Classification d'une collection de souches de bactéries corynéformes de la morge du Gruyère de Comté. *Lait* 70, 383-398
- Richard J (1980) Influence de l'agitation du lait cru sur les résultats de dénombrement de sa flore totale à l'aide d'une anse calibrée. *Lait* 60, 211-225
- Richard J (1981) Rapid picking up and purifying of aerobic microorganisms. *Lab Pract* 30, 342-344
- Rogosa M, Cummins CS, Lelliott RA, Keddie RM (1974) *Actinomycetes* and related organisms. Coryneform group of bacteria. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th edn* (Buchanan RE, Gibbons NE, eds) The Williams and Wilkins Co, USA, 599-632
- Ruegg M, Blanc B (1977) Beziehungen zwischen Wasseraktivität, Wasser-Sorptionsvermögen und Zusammensetzung von Käse. *Milchwissenschaft* 32, 193-201
- Scott WG (1957) Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv Food Res* 7, 83-127
- Winston PW, Bates DH (1960) Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* 41, 232-237