



HAL
open science

Mise au point d'une grille simplifiée d'identification des principales espèces de levures présentes dans les fromages

Catherine Baroiller, J. L. Schmidt

► **To cite this version:**

Catherine Baroiller, J. L. Schmidt. Mise au point d'une grille simplifiée d'identification des principales espèces de levures présentes dans les fromages. *Le Lait*, 1984, 64 (635_636_637), pp.16-28. hal-00928995

HAL Id: hal-00928995

<https://hal.science/hal-00928995>

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.

Mise au point d'une grille simplifiée d'identification des principales espèces de levures présentes dans les fromages

par

Catherine BAROILLER et J.L. SCHMIDT*

Résumé

L'identification des levures présente un certain nombre de difficultés et les grilles classiques sont relativement lourdes à mettre en œuvre. Dans le cas des fromages, où le nombre d'espèces est limité, il est possible d'envisager la mise au point d'une grille simplifiée d'identification pour celles qui sont les plus fréquemment rencontrées.

La grille proposée, après vérification sur des souches préalablement identifiées selon les méthodes classiques, permet un pourcentage d'identification correcte voisin de 89 %.

Mots clés : Levures - Fromages - Identification - Grille simplifiée.

Summary

ESTABLISHMENT OF A SIMPLIFIED IDENTIFICATION SCALE FOR MAIN SPECIES OF CHEESE YEASTS

Yeasts identification leads to numerous difficulties and standard scales require a long and painful setting. In the case of cheeses where only a few species of yeasts are concerned, we have been able to establish a simplified identification scale for the most frequently met species.

* Laboratoire de Recherches de la Chaire de Technologie, I.N.R.A., Institut National Agronomique Paris-Grignon - 78850 Thiverval-Grignon.

After verification on previously identified strains according to classical methods, the proposed scale allows a correct identification percentage nearing 89 %.

Key words: Yeasts - Cheese - Identification - Simplified scale.

INTRODUCTION

Les levures appartiennent à la flore microbienne normale de la plupart des fromages et, dans certains types de pâtes, elles sont susceptibles de participer activement aux modifications biochimiques qui sont à l'origine du développement de la saveur et de l'arôme (Gripon, 1978 ; Schmidt et coll., 1979 ; Schmidt, 1984).

Leur identification, selon les méthodes conventionnelles (Lodder, 1971 ; Barnett et Pankhurst, 1974 ; Barnett et coll., 1979), repose sur la détermination de divers caractères morphologiques ou physiologiques et certaines de ces déterminations sont d'une mise en œuvre lourde ou difficile. Les critères morphologiques comportent l'aspect de la cellule, l'aptitude à la filamentation et à la sporulation, l'apparence des cultures en milieu liquide et sur milieu solide. Parmi les critères physiologiques, figurent l'assimilation de divers composés azotés, l'assimilation et la fermentation de différentes sources de carbone, la résistance à certaines conditions défavorables du milieu de culture (présence d'antibiotiques, absence de vitamines...).

Selon les données de Barnett et coll. (1979), 439 espèces de levures, appartenant à 57 genres, ont été recensées et sont identifiables par ces méthodes. Or, un nombre restreint d'entre elles a été mis en évidence sur les différents types de fromages qui ont été étudiés (tab. 1). Quelques espèces apparaissent fortement dominantes : les *Kluyveromyces* (*Kl. lactis*, *Kl. marxianus*, *Kl. bulgaricus*), *Debaryomyces hansenii* et *Saccharomyces cerevisiae*. Ont été également reconnues, les espèces *Zygosaccharomyces rouxii* et *Torulopsis versatilis*.

Le fromage est donc un biotope dont la flore levure est relativement peu diversifiée ; aussi, la suppression de tests d'identification qui ne concernent que des levures issues d'autres milieux est envisageable.

Les méthodes rapides actuellement commercialisées (API 50 CH...) peuvent, dans certains cas, se substituer valablement à la démarche classique d'identification, par exemple pour les levures rencontrées en milieu hospitalier. En revanche, elles s'avèrent inadaptées pour les espèces isolées des fromages (Schmidt, 1980).

Il nous a paru utile, dans ces conditions, de concevoir une méthode rapide d'identification, grâce à l'établissement d'une grille

simplifiée, à partir des données physiologiques de Barnett et Pan-
khurst (1974) et de Barnett et coll. (1979).

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

I. Mise au point de la grille simplifiée d'identification

Les modifications apportées à la grille classique d'identification reposent essentiellement sur la réduction du nombre de tests physiologiques et sur la conservation de tests morphologiques indispensables.

1.1. Choix des tests physiologiques

Buhagiar et Barnett (1971) préconisent un choix judicieux des tests physiologiques à appliquer pour l'identification de souches de levures prélevées à partir d'un biotope donné. Dans notre étude, les espèces de levures ont été isolées de fromages de Camembert affinés ou en cours d'affinage, issus de cinq fabrications en lait cru (Schmidt et Lenoir, 1980). Elles sont, pour l'essentiel, au nombre de 7 (avec également 3 formes anascosporogènes) :

- *Kluyveromyces lactis* (Dombrowski) Van der Walt (forme anascosporogène, *Torulopsis sphaerica*) (Hammer et Cordes) Lodder;
- *Saccharomyces cerevisiae* Hansen ;
- *Kluyveromyces marxianus* (Hansen) Van Der Walt (forme anascosporogène, *Candida pseudotropicalis*) (Cast) Basgal ;
- *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-Van Rij ;
- *Zygosaccharomyces rouxii* (Boutroux) Yarrow (forme anascosporogène, *Torulopsis mogii*) (Vidal-Leiria) ;
- *Kluyveromyces bulgaricus* (Santa Maria) Van der Walt ;
- *Torulopsis versatilis* (Etchells et Bells) Lodder et Kreger Van-Rij.

Certaines de ces espèces (*Kluyveromyces lactis*, *Debaryomyces hansenii* et *Kluyveromyces marxianus*) se retrouvent également dans d'autres types de fromages (tab. 1).

Dans l'étude précitée, d'autres espèces ont été reconnues, mais en faible proportion (environ 5 % de la flore levure identifiée) ; en outre, leur répartition est très variable selon les fabrications ou les stades d'affinage.

Les tests physiologiques indiquent si une espèce est apte ou non à croître dans des conditions de milieu définies ou à transformer tel ou tel composant de ce milieu. Si toutes les souches d'une espèce ont le même comportement, la réponse au test est sans ambiguïté,

TABLEAU 1 — TABLE 1

Identité des principales espèces de levures isolées à partir de différents fromages
Identification of main yeasts species from different cheeses

Roquefort (DEVUYOD et SPONEM, 1970) = 81 souches :	
<i>Kluyveromyces lactis</i> :	29,6 %
<i>Debaryomyces hansenii</i> :	22,2 %
<i>Hansenula anomala</i> :	14,8 %
<i>Pichia membranaefaciens</i> :	7,4 %
<i>Kluyveromyces marxianus</i> :	6,2 %
Cabrales (NUNEZ et coll., 1981) = 99 souches :	
<i>Debaryomyces hansenii</i> :	31,3 %
<i>Pichia membranaefaciens</i> :	22,2 %
<i>Pichia fermentans</i> :	16,2 %
<i>Geotrichum capitatum</i> :	15,1 %
<i>Pichia kluyveri</i> :	6,1 %
<i>Kluyveromyces lactis</i> :	3,0 %
Saint-Nectaire (VERGEADE, 1975) = 156 souches :	
<i>Debaryomyces hansenii</i> :	85,9 %
<i>Kluyveromyces lactis</i> :	10,3 %
Cantal (MILLET et coll., 1974) = 38 souches :	
<i>Kluyveromyces lactis</i> :	47,4 %
<i>Pichia sp.</i> :	} 47,3 %
<i>Rhodotorula sp.</i> :	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> :	5,3 %
Camembert (SCHMIDT et LENOIR, 1978, 1980) = 482 souches :	
<i>Kluyveromyces lactis</i> :	33,8 %
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> :	22,0 %
<i>Kluyveromyces marxianus</i> :	15,4 %
<i>Debaryomyces hansenii</i> :	13,5 %
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> :	3,8 %
<i>Torulopsis versatilis</i> :	3,3 %
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i> :	2,7 %

positive ou négative. Parfois, cependant, les souches d'une espèce différent dans leurs comportements ; la réponse est alors notée variable. Dans ce cas, l'épreuve n'a pas de valeur significative pour l'identification de l'espèce. Sur cette base, dans un premier temps, parmi les 62 tests utilisés par Barnett et Pankhurst (1974) et les 78 de Barnett et coll. (1979), nous avons éliminé ceux qui ne permettent pas de différencier sûrement au moins deux des sept espèces étudiées, un caractère + de l'une s'opposant au caractère — d'une autre.

Dans un second temps, les tests donnant des réponses toujours identiques ont fait l'objet d'une sélection ; un seul a été retenu, la

préférence allant aux épreuves communes aux 2 clés de détermination. Ainsi, par exemple, le caractère ascosporegène a été retiré compte tenu de l'identité de ses réponses avec celles du test d'assimilation du nitrate de potassium. Selon ces critères, la grille finalement adoptée comporte 11 tests physiologiques (tab. 2) :

— neuf épreuves correspondent à l'assimilation des hydrates de carbone (maltose, cellobiose, lactose, inuline, amidon soluble, l-arabinose et mélézitose) et de composés azotés (éthylamine, nitrate de potassium) ;

— une épreuve concerne la résistance à la cycloheximide.

Un 11^e test a été ajouté : l'assimilation du glucose. La réponse est toujours positive pour toutes les espèces. L'épreuve sert alors de témoin de vitalité des souches, certaines souches de *Saccharomyces cerevisiae* pouvant présenter des réponses négatives pour tous les tests de la grille.

1.2. Critères morphologiques et caractères sexuels

En complément des épreuves physiologiques précédemment décrites, certains critères morphologiques ou caractères sexuels ont été conservés :

— la sporulation est à la base de la dichotomie entre les levures ascosporegènes (*Ascomycètes* et *Basidiomycètes*) et anascosporegènes (*Fungi imperfecti*). Les épreuves physiologiques ne permettent pas toujours de distinguer ces deux grands types, certaines levures anascosporegènes présentant en effet des profils identiques à ceux d'espèces ascosporegènes. Ainsi, l'étude de l'aptitude à la sporulation permet de distinguer *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* et *Zygosaccharomyces rouxii* de leurs formes imparfaites, respectivement, *Torulopsis sphaerica*, *Candida pseudotropicalis* et *Torulopsis mogii*. Cette discrimination n'est pas négligeable, car dans le cas de la flore levure du Camembert, l'espèce *Kluyveromyces lactis* est beaucoup moins représentée que sa forme imparfaite (Schmidt et Lenoir, 1978, 1980) ;

— les aspects culturels en milieu liquide et sur milieu solide sont enregistrés ; ils n'alourdissent d'ailleurs pas la grille puisque les 2 types de culture interviennent dans le processus de purification des souches (Schmidt et Lenoir, 1978) ;

— l'examen microscopique précise la forme et les dimensions des cellules ; en outre, il permet de dépister la présence éventuelle de micro-organismes contaminants susceptibles de fausser les réponses des tests physiologiques.

La grille repose donc finalement sur la mise en œuvre de 11 tests physiologiques reconnus comme les plus discriminants pour l'identification des principales espèces de levures des fromages et de 4 critères morphologiques considérés comme indispensables.

II. Matériel et méthodes

2.1. Tests physiologiques

Les hydrates de carbone (tab. 2) sont employés à la concentration finale de 0,5 % dans le milieu Yeast Nitrogen Base Difco (YNB). Le nitrate (0,078 %), l'éthylamine (0,064 %) et la cycloheximide (0,01 %) sont introduits dans le milieu Yeast Carbon Base Difco (YCB). Ces milieux sont répartis en boîtes de Pétri, puis ensemencés simultanément avec 20 souches de levures à l'aide de l'appareil inoculateur multipoint (Ridgway-Watt, 1979).

La lecture s'effectue, après incubation des boîtes à 25° C, par comparaison avec un témoin de croissance minimum (milieux YNB ou YCB, seuls) et un témoin de vitalité (YNB + glucose). Les croisances intermédiaires, par rapport à ces 2 témoins, sont enregistrées comme réponses variables.

Les résultats obtenus, regroupés sous forme d'une grille, sont, pour chaque souche, directement comparés aux réponses théoriques des 7 espèces de levures de la grille simplifiée. Lorsqu'il y a concordance avec l'une des espèces, la souche est identifiée ; sinon, la souche est considérée comme pouvant appartenir au groupe des espèces mineures présentes dans les fromages et son identification supposera la mise en œuvre des méthodes classiques.

2.2. Tests morphologiques et sporulation

— l'aspect des cultures est noté après 72 h d'incubation à 25° C sur bouillon Y.E.G. (extrait de levure, 0,5 % ; glucose, 2 %) et sur milieu Y.E.G. gélosé ;

— l'examen microscopique est effectué sur les cultures en bouillon de 72 h ;

— la sporulation (présence, forme et nombre des ascospores) est observée au microscope sur les cultures en milieu V8 (Wickerman, 1946) et en milieu à l'acétate de sodium (Fowell, 1952), après 15 jours d'incubation à 25° C.

RESULTATS

Après avoir établi, sur une base purement théorique, une grille simplifiée d'identification des espèces de levures les plus fréquemment rencontrées dans les fromages, il était nécessaire d'apprécier son efficacité par détermination de souches déjà connues ; ceci s'imposait pour plusieurs raisons :

— les données isolées de la littérature pour l'établissement de la grille correspondent à des résultats de croissance en milieu liquide, alors que dans la présente étude, les tests physiologiques, de façon

TABLEAU 2 — TABLE 2

Grille simplifiée d'identification des levures de fromages — *Simplified identification scale of cheese yeasts*

Espèces	Gluc.	Malt.		Cell.		Lact.		Inul.		Amid.		L. Ara		Mlz.		Ethyl.		Cycloh.		Nit.	
	1	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	+	+	v	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	v	v	—	—	—	—	v	—	—	v	v	—	v	v	—	—	—	—	—	—
<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	+	+	+	+	v	v	v	v	+	+	+	+	+	+	v	v	v	v	—	—
<i>Kluyveromyces bulgaricus</i>	+	—	—	—	v	v	v	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	+	+	—	—	+	+	+	+	—	—
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	v	v	+	+	+	v	v	v	—	—	—	v	+	v	+	+	+	+	—	—
<i>Torulopsis versatilis</i>	+	+	+	v	v	v	v	—	—	—	—	v	v	—	—	v	v	v	v	+	+

1 : BARNETT et PANKHURST (1974) — 2 : BARNETT et coll. (1979).

+ : caractère positif.

— : caractère négatif.

v : caractère variable.

Codes in table : + positive.

— negative.

v variable.

à permettre leur automatisation, reposent sur une croissance en milieu solide ;

— ne disposant pas d'informations précises à ce sujet, il convenait d'évaluer le temps d'incubation nécessaire pour que la lecture des réponses se fasse dans des conditions optimales ; le problème se posait, notamment, pour les souches à croissance lente ;

— les milieux gélosés, du fait de leur mode de conditionnement, sont plus propices aux contaminations que les milieux liquides et, après un certain temps d'incubation, ils peuvent se dessécher ; l'ampleur et l'incidence de ces phénomènes devaient être appréciées.

Les tests physiologiques de la grille ont été appliqués à une collection de 149 souches identifiées selon les méthodes classiques (Schmidt et Lenoir, 1978, 1980) et appartenant aux principales espèces et à quelques espèces mineures des fromages de Camembert.

Les résultats obtenus (tab. 3) montrent que le temps optimal de lecture se situe entre 6 et 8 jours d'incubation à 25° C. La proportion de souches correctement identifiées après ce temps de culture est de 74 % sur la base des données de Barnett et Pankhurst (1974) ; mais si, comme le suggèrent Barnett et coll., (1979), les 3 espèces de *Kluyveromyces* sont regroupées, ce qui alors ne permet pas toujours de différencier les souches, le pourcentage atteint 89 %. Les

TABLEAU 3 — TABLE 3

Evaluation de la grille simplifiée — *Estimate of the simplified scale*

Temps de lecture (en jours)	4	6	8
Pourcentage d'identification			
(1)	70,0	73,6	74,2
(2)	89,2	88,4	89,0

(1) Toutes espèces séparément.

(2) Les trois espèces de *Kluyveromyces* confondues.

(1) *Each species separately.*

(2) *The three Kluyveromyces species mixed.*

11 % de souches non identifiées correctement correspondent à des espèces mineures isolées antérieurement (Schmidt et Lenoir, 1980).

Il convient, à ce sujet, de mentionner que la grille doit être complétée par d'autres tests physiologiques (notamment fermentation des sucres) si l'on veut établir l'identité de ces souches.

DISCUSSION - CONCLUSION

Ces résultats peuvent être considérés comme suffisamment satisfaisants pour permettre l'identification d'un grand nombre de souches isolées de fromages. La méthode permet en effet de réduire considérablement le nombre de tests et elle est bien adaptée à l'étude de populations importantes. Le protocole étant simplifié, il devient alors possible d'envisager l'étude de l'origine des levures des laits et des fromages ou de suivre l'évolution qualitative de cette flore au cours de l'année et/ou au cours de l'affinage, ce qui était difficilement envisageable auparavant.

On relèvera cependant que la proportion de réponses correctes dépend de la classification de Barnett à laquelle on se réfère. Ainsi, en ce qui concerne les espèces de la grille, 8 variations existent entre les 2 clés de détermination (tab. 2). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène :

— au plan pratique, le nombre de souches étudiées a vraisemblablement augmenté dans l'intervalle de temps qui sépare les 2 études : par conséquent, l'isolement des souches ayant des aptitudes physiologiques ou biochimiques différentes de celles des souches de référence est probable. Par ailleurs, il est bien connu que les repiquages successifs favorisent les mutations ;

— au plan théorique, les « nouvelles » méthodes d'identification (taxonomie numérique, G + C %, structure de la paroi, structure antigénique, étude du coenzyme Q,...) ont tendance à regrouper ou à distinguer les espèces indépendamment de leurs réponses aux différents tests physiologiques (Schmidt, 1983). Les espèces ainsi remaniées présentent alors un spectre de réponses à ces épreuves avec un nombre accru de caractères variables. Cette remarque s'applique tout particulièrement aux genres *Saccharomyces* (*Saccharomyces italicus* étant désormais assimilé à *Saccharomyces cerevisiae*) et *Kluyveromyces*. Selon Barnett et coll. (1979), *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces bulgaricus* ne sont plus clairement différenciés de *Kluyveromyces marxianus*, bien que ces 3 espèces soient reconnues indépendantes les unes des autres par certaines taxonomies modernes (Poncet, 1973).

Il devient donc nécessaire, si l'on souhaite établir avec certitude l'identité de ces 3 espèces, d'utiliser les anciennes données de Barnett et Pankhurst (1974).

La réduction du nombre de tests physiologiques, lors de l'élaboration de la grille, introduit un risque d'identification incorrecte, surtout si la méthode est appliquée à des souches de levures prélevées à partir d'écosystèmes autres que les fromages. Ainsi, la comparaison du profil physiologique des espèces de la grille avec celui des 439 espèces décrites par Barnett et coll. (1979), pour les 10 tests retenus, a permis de déterminer quelles espèces risquaient, théoriquement, d'être confondues avec l'une ou l'autre des espèces de la grille. Leur nombre s'est avéré important, notamment, pour *Zygosaccharomyces rouxii* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Cependant, certaines de ces espèces présentent une très faible probabilité d'être isolées à partir des fromages. Après une première approche portant sur l'ensemble des espèces de levures, seules ont été retenues celles qui peuvent être isolées à partir des principaux vecteurs d'introduction de ces micro-organismes, l'eau, le sol, l'air et les insectes, car elles sont susceptibles d'être rencontrées en fromagerie, ainsi que les espèces reconnues associées aux humains et aux produits laitiers (Lodder, 1971). Les espèces courantes des milieux salés ont été écartées, car, selon Phaff et coll. (1978), *Debaryomyces hansenii*, levure relativement ubiquitaire, serait seule capable de résister à la dessiccation de l'eau de mer. Elle pourrait être ainsi transmise aux saumures de fromagerie, fait corroboré par les travaux de Mansour et Alais (1973) qui l'ont trouvée comme seule espèce présente dans les saumures. Parmi les levures restantes, certaines peuvent être éliminées sur la base de quelques tests morphologiques. Ainsi, la sporulation permet d'écartier les levures anascosporogènes pouvant être identifiées comme *Saccharomyces cerevisiae* ou *Zygosaccharomyces rouxii*, la présence de spores étant facilement observée chez ces 2 espèces. Dans le cas de *Debaryomyces hansenii*, la sporulation est difficilement obtenue par suite, semble-t-il, d'une température d'incubation trop élevée (Mrak et Bonar, 1938) ; une sélection sur cette base devient alors incertaine. Pour *Torulopsis versatilis*, levure anascosporogène, les levures ascosporogènes peuvent être écartées. Un problème particulier se pose avec les formes imparfaites de *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* et *Zygosaccharomyces rouxii* qui sont présentes en grand nombre dans les fromages (Schmidt et Lenoir, 1980). Dans ces 3 cas, il a fallu réintroduire les levures anascosporogènes.

La morphologie cellulaire typique de certaines espèces restreint les risques d'erreurs. Par exemple, *Saccharomyces kluyveri* possède des cellules de très grande taille, *Brettanomyces anomalus* a des cellules dont la base est en ogive. Enfin, la fréquence de l'espèce peut être prise en considération. Lorsqu'une levure a été très peu souvent isolée, il est permis de supposer qu'elle est rare dans la nature ou éventuellement mal définie. De plus, il convient de rappeler que la plupart des levures présentent généralement une localisation géographique particulière (Phaff et coll., 1978).

TABLEAU 4 — TABLE 4

Risques d'identification incorrecte — Possibilities of inaccurate identification

1. Avec *Saccharomyces cerevisiae* ou *Zygosaccharomyces rouxii* :

Espèces	Habitat
<i>Pichia fermentans</i> <i>Pichia membranaefaciens</i> <i>Pichia kluyveri</i> <i>Saccharomyces telluris</i> <i>Yarrowia lipolytica</i>	Babeurre, fromages. Yoghourts, fromages. Fromages. Sol, fromages. Sol, fromages.

2. Avec *Debaryomyces hansenii* :

<i>Cryptococcus laurentii</i>	Ubiquitaire.
-------------------------------	--------------

3. Avec *Torulopsis versatilis* :

<i>Cryptococcus terreus</i>	Sol.
-----------------------------	------

4. Avec les formes imparfaites de *Kluyveromyces lactis* ou *Kluyveromyces marxianus* :

<i>Candida kéfir</i>	Espèce mineure du Camembert, identique en fait à <i>Candida pseudotropicalis</i> variété <i>lactosa</i> , espèce très proche de <i>Candida pseudotropicalis</i> , forme imparfaite de <i>Kluyveromyces marxianus</i> .
----------------------	--

5. Avec la forme imparfaite de *Zygosaccharomyces rouxii* :

<i>Torulopsis holmii</i> = <i>Saccharomyces exiguus</i>	Sol, fromages.
--	----------------

Finalement, en prenant en compte ces différents éléments, seul un petit nombre d'espèces offre un risque d'identification erronée par l'emploi de la grille simplifiée (tab. 4). Ces risques concernent essentiellement *Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces rouxii*. Aussi, dans le cadre d'une étude portant sur la flore d'un fromage autre que le Camembert, comme le Cantal ou le Cabrales (tab. 1) où les espèces appartenant au genre *Pichia* sont relativement bien représentées, il serait bon, dans un premier temps, de confirmer

par identification classique les espèces *Saccharomyces cerevisiae* et *Zygosaccharomyces rouxii* reconnues par utilisation de la grille simplifiée.

Observons pour conclure que la méthode proposée apporte d'importantes améliorations par la réduction du nombre des tests physiologiques et l'utilisation de la technique auxanographique qui, pour les levures, est d'un emploi plus aisé, de lecture plus rapide et plus nette que les méthodes d'assimilation en milieu liquide. Sa relative simplicité la rend utilisable dans un laboratoire industriel.

Remerciements

Nous remercions J. L. Bergère pour la lecture critique du manuscrit.

Bibliographie

- BARNETT (J. A.), PANKHURST (R. J.) (1974). — A new key to the Yeasts. North Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
- BARNETT (J. A.), PAYNE (R. W.), YARROW (D.) (1979). — A guide to identifying and classifying yeasts. Cambridge University Press, Cambridge.
- BUHAGIAR (R. W. M.), BARNETT (J. A.) (1971). — The yeasts of strawberries. *J. appl. Bact.*, 34 (4), 727-739.
- DEVOYOD (J. J.), SPONEM (D.) (1970). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures. *Le Lait*, 498, 524-543.
- FOWELL (R. R.) (1952). — Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast. *Nature*, 170, 578.
- GRIPON (J. C.) (1778). — Levures et moisissures intervenant dans la préparation des produits laitiers. C.R. 20^e Cong. Int. Lait., 4 ST.
- LODDER (J.) (1971). — «The yeasts. A taxonomic study». North Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
- MANSOUR (A.), ALAIS (Ch.) (1973). — Etude du salage et de l'affinage du fromage en saumure. III. Aspect bactériologique. *Le Lait*, 523-524, 137-145.
- MILLET (L.), MELCION (D.), DEVOYOD (J. J.) (1974). — La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. III. Rôle des levures dans la maturation de la « Tome ». *Le Lait*, 539-540, 616-626.
- MRAK (E. M.), BONAR (L.) (1938). — *Mycologia*, 30, 182, cité par LODDER (J.) (1971). — In «The yeasts. A taxonomic study». North Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
- NUNEZ (M.), MEDINA (Margarita), GAYA (Pilar), DIAZ-AMADO (Carmen) (1981). — Les levures et les moisissures dans le fromage bleu de Cabrales. *Le Lait*, 601-602, 62-79.
- PHAFF (H. J.), MILLER (M. W.), MRAK (E. M.) (1978). — Ecology, in «The Life of yeasts», p. 183-223, Harvard University Press, Cambridge-London.
- PONCET (Simone) (1973). — Taxonomie numérique du genre *Kluyveromyces*. *Mycopath. Mycol. Appl.*, 51 (4), 267.
- RIDGWAY-WATT (P.) (1979). — An improved automatic multipoint inoculator, in «Identification methods for microbiologists» by SKINNER (F. A.), LOVELOCK (D. W.), vol. 14, p. 297-304, Academic Press, London.

- SCHMIDT (J. L.), LENOIR (J.) (1978). — Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert. Son évolution au cours de la maturation. I. *Le Lait*, 577, 355-370.
- SCHMIDT (J. L.), GRAFFARD (Christine), LENOIR (J.) (1979). — Contribution à l'étude des aptitudes biochimiques de levure isolées du fromage de Camembert. I. Essais préliminaires. *Le Lait*, 583-584, 142-163.
- SCHMIDT (J. L.), LENOIR (J.) (1980). — Contribution à l'étude de la flore levure du fromage de Camembert. II. *Le Lait*, 595-596, 272-282.
- SCHMIDT (J. L.) (1980). — Evaluation d'une méthode rapide d'assimilation des sucres (API 50 CH) en vue de l'identification des levures. *Ann. Technol. Agric.*, 29 (1), 47-52.
- SCHMIDT (J. L.) (1978). — L'avenir des tests actuels : les levures. *Techn. Lait.*, 975, Avril, 31-36.
- SCHMIDT (J. L.) (1984). — La flore levure des fromages in « Le Fromage », p. 265-270, Lavoisier Diffusion, Paris.
- VERGEADE (J.) (1975). — Etude des levures du fromage de Saint-Nectaire. Thèse de Doctorat de troisième cycle (Université de Clermont-Ferrand).
- WICKERHAM (L. J.) (1946). — A critical evaluation of the nitrogen assimilation tests commonly used in the classification of yeasts. *J. Bact.* 52, 293.

Avertissement au lecteur

Depuis la rédaction de cet article, de nouvelles données sont apparues.

Une étude actuellement en cours sur la flore fongique de fromages de chèvre d'origines fermière et laitière met en évidence une population levure au sein de laquelle les espèces du genre *Candida* sont fortement représentées et ces espèces ne relèvent pas d'une identification au moyen de la grille simplifiée proposée ici.

Par ailleurs, une nouvelle édition de l'ouvrage de Barnett et coll. publiée fin 1983 et disponible en France depuis peu apporte certaines modifications à la taxonomie :

- Les espèces *Kluyveromyces lactis* et *Kluyveromyces bulgaricus* sont désormais assimilées à *Kluyveromyces marxianus* dont la forme anascosporogène devient *Candida kefyri*.

- L'espèce *Debaryomyces hansenii* possède de nouveau une forme imparfaite, *Candida famata*.

- *Torulopsis versatilis* a été transformé en *Candida versatilis*.

La grille simplifiée devra dans ces conditions faire l'objet d'un certain nombre de remaniements qui seront proposés dans une note complémentaire.

J. L. Schmidt.

Bibliographie

BARNETT (J. A.), PAYNE (R. W.), YARROW (D.) (1983). — Yeasts. Characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.