



HAL
open science

Evolution de la flore microbienne de surface du gruyère de Comté au cours de l'affinage

Christine Piton

► **To cite this version:**

Christine Piton. Evolution de la flore microbienne de surface du gruyère de Comté au cours de l'affinage. *Le Lait*, 1988, 68 (4), pp.419-433. <hal-00929141>

HAL Id: hal-00929141

<https://hal.science/hal-00929141v1>

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.



HAL Authorization

Evolution de la flore microbienne de surface du gruyère de Comté au cours de l'affinage

Christine PITON

INRA, Station expérimentale laitière, BP 94, 39800 Poligny, France.

Résumé

La flore microbienne de la morge du Gruyère de Comté a été étudiée sur 6 lots de fromages issus de 6 fromageries différentes. Les prélèvements de morge ont été effectués par grattage, à neuf stades de l'affinage des fromages ; ils ont été soumis au dénombrement de la flore « totale » sur milieu salé au lactate, de la flore bactérienne halotolérante sur milieu Mannitol Salt Agar tamponné additionné d'amphotéricine B (20 mg/l), des levures et de la flore capable de croître sur milieu Nutrient Agar additionné d'amphotéricine B (20 mg/l) et de cristal violet (2 mg/l).

Cinq cent soixante huit souches, orange et non pigmentées, ont été prélevées sur milieu MSA à cinq stades de l'affinage des fromages ; elles ont été soumises aux six 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, acidification du milieu MSA et, pour les colonies orange, production d'une teinte rouge des colonies au contact d'une solution de soude 5N. Une collection de 590 souches résistantes au cristal violet, représentative des neuf stades d'affinage, a été soumise aux six tests suivants : morphologie et mobilité des cellules, test O/F, cytochrome-oxydase, résistance à la pénicilline et réaction de Gram.

On a observé une implantation très rapide de la flore microbienne à son niveau maximum, avec une succession levures/bactéries ; généralement, ce niveau de plus de 10^{10} micro-organismes/cm² croûte est atteint au bout de 8 à 15 jours. Peu de différences entre fromageries ont été mises en évidence, sur le plan du niveau et/ou de la nature de la flore microbienne de surface. Quel que soit le groupe pigmentaire, la flore halotolérante est constituée de deux grands groupes de micro-organismes : bactéries corynéformes et *Micrococcaceae*. Hormis pour les souches jaunes, les bactéries corynéformes forment la flore dominante en fin d'affinage.

La flore résistante au cristal violet s'installe assez tardivement (vers le 30^e jour après la fabrication) et ne constitue toujours qu'un élément mineur de la flore totale. Cette flore est, en fin d'affinage, constituée essentiellement de bactéries identifiables à *Moraxella*.

Mots clés : Gruyère de Comté, Morge, Flore microbienne, Levures, Bactéries corynéformes, Evolution.

Summary

Evolution of the dominant microbial flora of the smear of Comté cheese during ripening

The microbial flora of the smear of Comté cheese has been studied in six plants at one period of the year. The samples have been taken by scratching the surface of the wheels at nine different stages of ripening ; « total flora » on salted lactate medium, salt tolerant bacteria on buffered Mannitol Salt Agar supplemented with Amphotericin B, yeasts and crystal violet resistant bacteria have been enumerated.

568 colonies, orange and non pigmented, have been isolated from Mannitol Salt Agar at five stages of ripening ; they have been characterized using six tests : cell morphology and motility after one day and one week of growth, Gram reaction, resistance to penicillin and nalidixic acid, acidification of Mannitol Salt Agar and for orange strains, colony colour change to red in presence of 5N NaOH. A collection of 590 crystal violet resistant strains, representative for all stages of ripening has been submitted to the six following tests : cell morphology and motility, O/F test, cytochrome-oxydase, resistance to penicillin and Gram reaction.

A rapid growth of the microbial flora at the surface of the cheeses has been observed, with a succession yeasts/bacteria. A maximum level of 10^{10} micro-organisms/cm² was in general reached after 8 or 15 days of ripening. Few differences between plants were noted in nature and/or level of the microbial flora growing at the surface of the cheeses. Whatever the pigment group, the salt tolerant flora was composed of coryneform bacteria and *Micrococcaceae*. Except for the yellow strains, coryneform bacteria were dominating at the end of ripening.

The crystal violet resistant flora was growing in a later period at the surface of cheese after 30 days of ripening. At the end of ripening, this flora was essentially composed of bacteria identified as *Moraxella*.

Key words : Gruyère of Comté cheese, Smear, Microbial flora, Yeasts, Coryneform bacteria, Evolution.

Introduction

Au cours de l'affinage des fromages de Comté et de Beaufort, les soins pratiqués en cave (salages et frottages répétés deux à trois fois par semaine) maintiennent humide la surface de ces fromages et conduisent à la formation d'un enduit superficiel riche en micro-organismes, appelé « morge ». Cette morge est généralement considérée comme responsable des caractéristiques organoleptiques particulières de ces fromages ; ces qualités sont en effet très différentes de celles de l'Emmental dont la surface est frottée « à sec » pendant l'affinage pour éviter tout développement microbien (ACCOLAS *et al.*, 1978). Plusieurs rôles peuvent être attribués aux micro-organismes de la morge : production d'ammoniac et de composés volatils (BLANC *et al.*, 1983 ; DASEN *et al.*, résultats non publiés), sécrétion d'enzymes (MEYER *et al.*, 1985), production d'arômes (DUMONT *et al.*, 1981) ou de mauvais goûts (DUMONT *et al.*, 1975), régulation de la diffusion des gaz entre l'atmosphère et la pâte (DASEN *et al.*, résultats non publiés), barrière contre l'implantation de micro-organismes indésirables (LEWIS, 1980). Il nous a donc

paru intéressant de connaître la nature et les propriétés technologiques (propriétés biochimiques, production de gaz et d'arômes...) et écologiques (conditions de croissance) de cette flore.

Peu d'études ont été consacrées jusqu'à présent à la nature de la flore microbienne de surface des fromages à croûte emmorgée. Il semble tout d'abord que la morge soit constituée d'une flore assez homogène, d'un fromage à l'autre et d'une cave d'affinage à une autre (ACCOLAS *et al.*, 1978). D'après ces auteurs, cette flore est composée essentiellement de bactéries et de levures et s'établit à des niveaux très élevés dès le début de l'affinage (respectivement à plus de 10^{11} et 10^9 micro-organismes/g de morge) ; la flore bactérienne capable de croître sur des milieux contenant 6,5 % de sel est composée principalement de corynébactéries tandis que microcoques et bacilles à Gram négatif ne représentent qu'environ 5 % de la flore. Alors que le nombre de levures décroît progressivement à partir de trois semaines d'affinage, le niveau de la flore bactérienne se maintient à un niveau élevé jusqu'en fin d'affinage (ACCOLAS *et al.*, 1978 ; BLANC *et al.*, 1983).

On ne dispose donc que d'informations très fragmentaires et peu précises sur la flore microbienne de la morge du Comté. De plus, ACCOLAS *et al.* (1978) ont comparé, dans leur étude, le milieu Plate Count Agar et ce même milieu additionné de 6,5 % de chlorure de sodium, sans observer de différences. Ils ont sans doute perdu une partie de la flore présente ; en effet, il a été montré (RICHARD *et al.*, 1983) que le milieu PCA n'est pas satisfaisant pour une grande partie des bactéries corynéformes et des *Micrococcaceae* des fromages. Par ailleurs, le mode de prélèvement des échantillons de morge ainsi que leurs conditions de préparation ne sont pas indiqués dans les études citées précédemment. Or, on a déjà montré dans beaucoup d'autres domaines (COUSINS, 1963 ; FAVERO *et al.*, 1968 ; RICHARD et PITON, 1986 ; BOURLIOUX et BARC, 1978) que la technique utilisée pour le prélèvement des flores de surface peut avoir des répercussions très importantes sur l'estimation du niveau de cette flore. De même, on connaît le rôle du diluant employé sur la viabilité des cellules microbiennes (STRAKA et STOKES, 1957). Cela nous a incité à entreprendre une étude de la flore microbienne de la morge des fromages à pâte pressée cuite. Pour un premier travail, nous nous sommes limités à un inventaire de la flore microbienne dominante de la morge du Comté à divers stades de l'affinage des fromages.

I. Matériel et méthodes

A. Origine et prélèvement des échantillons

Six fromageries artisanales (A à F), réparties autour de Poligny et dans le département du Doubs ont été sélectionnées. Elles livrent leurs fromages chez deux affineurs différents : les fromageries A, B et C chez l'affineur 1 et les fromageries D, E et F chez l'affineur 2. Elles présentent des caractéristiques de préaffinage variables : température (entre 11 et 14 °C), âge des fromages lors des premiers soins (24 ou 48 h)... Dans chaque coopérative, quatre fromages de la fabrication du 15/09/1986 ont été choisis au hasard et identifiés à l'aide d'un tampon. Ils ont fait l'objet de prélèvements aux stades suivants : au démoulage, 24 h après la fabrication puis à 2, 4, 8, 15, 30, 45, 60 et 90 j après la fabrication. Tous les fromages ont été livrés chez l'affineur environ 30 j après la fabrication.

Les prélèvements ont été effectués dans six carrés de 5 cm de côté, délimités à l'aide d'un gabarit en carton et répartis sur la face qui a subi, depuis plus de 24 h, les derniers soins apportés au fromage. Ce plan nous est apparu comme un bon compromis entre la réalisation pratique et la précision des résultats des dénombrements. Ces prélèvements ont été effectués par grattage à l'aide d'une spatule désinfectée à l'alcool ; la morge recueillie sur les quatre fromages a été réunie pour constituer un échantillon moyen par fromagerie. Nous avons choisi ce mode de prélèvement car il nous a permis de récolter, avec une reproductibilité satisfaisante, environ 90 à 95 % de la flore de surface du Comté.

À l'arrivée au laboratoire, les échantillons ont été pesés dans un flacon contenant du milieu Brain Heart Infusion (BHI, Institut Pasteur Production) et homogénéisés pendant 30 s à l'aide d'une turbine (appareil Ultra Turrax, type TP 18/2) tournant à 20 000 tours/mn. Le traitement avec une turbine est destiné à obtenir une suspension homogène et à assurer une dispersion maximale des amas microbiens (RICHARD, 1980). L'examen par microscopie en épifluorescence (PETTIPHER *et al.*, 1980 ; DASEN *et al.*, 1987) de près de 3 000 amas colorés à l'acridine orange nous a permis de vérifier qu'après passage à l'Ultra Turrax, environ 85 % de la flore de la morge se trouve sous forme de cellules isolées ou groupées par deux.

Les suspensions ont été conservées à 0 °C dans de la glace fondante, une heure au plus, en attendant l'analyse microbiologique. Les dilutions suivantes ont été réalisées dans de l'eau peptonée à 1 g/l.

B. Dénombrements microbiens

1. Milieux de culture

a - « Flore totale »

Après l'essai de plusieurs milieux nutritifs, nous avons retenu celui qui permet à la fois la culture du nombre maximum de cellules présentes et le développement optimum de la taille et de la pigmentation des colonies. Par ailleurs, les résultats des dénombrements avec ce milieu ne diffèrent pas significativement de ceux obtenus par microscopie en épifluorescence ; ce milieu donne donc une bonne estimation du nombre total de cellules microbiennes de la morge. Ce milieu original, dit milieu au lactate, a la composition suivante (par litre) : tryptone (10 g), extrait de levure (5 g), lactate de sodium (5 g), chlorure de sodium (30 g), gélose (15 g). Nous l'avons additionné de 5 g/l de carbonate de calcium pour neutraliser une acidification éventuelle. En effet, les bactéries donnant des colonies orange apparentées à *Brevibacterium linens* sont, en présence de sel, très sensibles à une diminution du pH en dessous de la neutralité (MULDER *et al.*, 1966 ; RICHARD et ZADI, 1983).

b - Flore halotolérante

Nous avons utilisé le milieu hypersalé de Chapman ou Mannitol Salt Agar (MSA, Difco) additionné de 20 mg/l d'amphotéricine B (Fungizone) pour empêcher la croissance des levures et des moisissures (RICHARD et ZADI, 1983) et de 5 g/l de carbonate de calcium. Ce milieu a été retenu parce qu'il avait permis d'obtenir une croissance satisfaisante de la flore à Gram positif (bactéries corynéformes et *Micrococcaceae* en particulier) de la surface des camemberts (LENOIR, 1963 ; RICHARD et ZADI, 1983 ; RICHARD, 1984).

c - Flore à Gram négatif et levures

La flore à Gram négatif a été dénombrée sur milieu Nutrient Agar (NA, Institut Pasteur Production) 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 des levures. Il a été montré (RICHARD *et al.*, 1983) qu'à cette concentration, le cristal violet permet la croissance des principales espèces microbiennes à Gram négatif du lait et des fromages.

Pour le dénombrement des levures, on a utilisé le milieu Yeast Extract Dextrose Chloramphénicol (Anon., 1980).

2. Ensemencement des milieux et comptage des colonies

Nous avons opté pour l'ensemencement en surface des boîtes de Petri car il permet de bien mettre en évidence l'aspect et la pigmentation des colonies. En outre, il facilite le prélèvement de celles-ci sans risque de contamination par des colonies voisines. Cet ensemencement est réalisé à l'aide de l'appareil Spiral (GILCHRIST *et al.*, 1973). Cette méthode permet ainsi de réaliser, à l'aide d'une seule boîte de Petri de 140 mm de diamètre, un dénombrement sur des inoculums contenant de 10^3 à 10^6 cellules/ml.

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 à 3 semaines afin de permettre un développement maximum des colonies et de leur pigmentation. On y effectue une numération des divers types de colonies se distinguant par l'aspect (pigmentation, opacité). Les principaux types se sont révélés les mêmes que ceux observés pour les autres fromages (RICHARD et ZADI, 1983). On a pu différencier les types A (orange opaque), B (non pigmentées opaques), C (jaunes opaques) et D (autres aspects, généralement non pigmentées translucides).

Pour la flore à Gram négatif, les boîtes de Petri ont été mises à incuber pendant 48 heures à 30 °C ; pour les levures, elles ont subi une incubation de 3 jours à 30 °C.

C. Caractérisation de la flore microbienne dominante

1. Flore halotolérante

Aux 8^e, 15^e, 45^e, 60^e et 90^e jour d'affinage des fromages, on a prélevé, sur le milieu MSA tamponné, 16 à 24 colonies appartenant aux divers types morphologiques et pigmentaires A, B, C et D. Ces colonies ont été purifiées 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 a servi à ensemercer différents milieux répartis en boîtes de Petri de 14 cm à l'aide d'un inoculateur Multipoint. Les tests suivants ont été réalisés :

— morphologie et mobilité des cellules à l'état frais dans le bouillon BHI sur culture jeune (24 à 48 h) et sur culture âgée (1 semaine) de façon à mettre en évi-

dence 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 quatre souches différentes sur une lamelle microscopique de 24×60 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 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 à 20 s (micro-organismes KOH positifs) correspond à une réaction Gram négative (BUCK, 1982) ;

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

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

— pour les colonies orange, production d'une teinte rouge des colonies au contact d'une solution de soude 5N (JONES *et al.*, 1973).

Les micro-organismes sont classés en différents groupes sur la base de ces tests. Les bactéries sous forme de cocci en culture jeune, KOH négatifs, catalase positifs 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 évoluent vers des formes coccoïdes après une semaine de culture.

2. Flore à Gram négatif

Nous avons prélevé, au hasard, 12 à 16 colonies sur le milieu NA additionné de cristal violet, pour les neuf stades d'affinage étudiés. On n'a pas jugé utile de les purifier avant leur caractérisation car, avec l'agitation par turbine, moins de 5 % des agrégats de bactéries à Gram négatif contiennent plus de deux cellules (RICHARD, 1980) ; la probabilité pour qu'une colonie bien isolée soit pure est donc proche de 1.

Les suspensions de ces colonies ont été effectuées dans les alvéoles d'une plaque de microtitration stérile contenant 0,2 ml de bouillon BHI. Cette plaque a servi à ensemercer les milieux suivants, à l'aide d'un inoculateur Multipoint :

- NA additionné de cristal violet pour confirmation de croissance,
- NA (3 boîtes),
- NA additionné d'acide nalidixique (40 mg/l),
- NA additionné de pénicilline G (100 UI/ml).

La plaque de microtitration et les boîtes de Petri contenant ces milieux ont été mises à incuber à 30 °C. On a ensuite effectué les tests suivants :

— morphologie et mobilité des cellules après 24 h de culture à 30 °C dans le bouillon BHI,

— synthèse d'un pigment non diffusible après 3 à 5 j de culture à 30 °C sur milieu NA,

— réaction de Gram, en présence d'une solution de potasse, comme précédemment,

— culture en présence d'acide nalidixique et de pénicilline à 30 °C,

— voie de métabolisme du glucose par la méthode de PARK et HOLDING (1966). Le milieu de base (O/F, Difco) est bouilli pendant au moins 15 mn pour éliminer l'oxygène dissous, puis il est additionné d'une solution de glucose stérilisée par filtration (concentration finale : 10 g/l). Après mélange sans incorporation d'air, on répartit le milieu en clochettes de Durham stériles (2 ml/tube). Celles-ci sont ensemencées aussitôt en piqûres profondes par rang de huit à la fois, à l'aide d'un peigne flexible sur lequel sont montés 8 fils parallèles de ferro-nickel de 7 à 8 cm de longueur. L'inoculum est prélevé sur l'une des boîtes de Petri contenant le milieu NA. Les tubes sont examinés après 24 h d'incubation à 30 °C. Ce test donne quatre réponses différentes :

O = métabolisme par la voie oxydative (acidification du milieu en surface),

F = métabolisme par la voie fermentative (acidification du milieu dans tout le tube),

I = culture sans métabolisme du glucose et sans modification du milieu,

A = alcalinisation du milieu en surface.

— mise en évidence d'une cytochrome-oxydase c par la méthode de GABY et HADLEY (1957). On prépare extemporanément une solution à 1 % de N,N diméthylparaphénylène diamine et une solution à 1 % dans l'alcool à 95 ° GL d' α -naphtol. On recouvre les colonies d'une boîte de NA par un mélange (v/v) des deux réactifs. Après 5 à 10 s, on note comme positives les colonies qui deviennent bleu pâle ou bleu foncé. Les colonies négatives sont reprises pour confirmation sur l'autre boîte de NA et testées par la méthode de Kovacs (Disques Institut Pasteur Production).

Ces tests ont permis de classer les micro-organismes en différents groupes comme le montre le tableau suivant (REYN, 1974 ; HOLDING et SHEWAN, 1974 ; SHEWAN et VERON, 1974).

Groupe microbien	KOH (a)	Morphologie (b)	Mobilité	Test O/F (c)	Cytochrome oxydase	Pen (d)
<i>Moraxella</i>	+	CB - B	-	I	+	-
<i>Alcaligenes</i>	+	B	+	A	+	+
Bactéries à Gram positif	-	C ou B	-	F	-	-
<i>Vibrionaceae</i>	+	B	+	F	+	-

(a) KOH + = Gram - ; KOH - = Gram +

(b) B : bâtonnets ; CB : coccobacilles ; C : coques

(c) I : indifférent ; F : fermentatif ; O : oxydatif ; A : alcalinisant

(d) : Résistance à la pénicilline

II. Résultats

A. Évolution des différents groupes de micro-organismes au cours de l'affinage

Compte tenu des variations du poids de morge récoltée par unité de surface d'une fromagerie à l'autre et d'un stade d'affinage à l'autre, nous avons choisi d'exprimer les résultats des dénombrements en unités formant des colonies (UFC)/cm² de surface de croûte. Les coefficients de variation de reproductibilité de ces dénombrements sont présentés sur le tableau 1 ; ces coefficients ont été établis à partir des résultats des dénombrements obtenus sur deux échantillons de morge prélevés sur le même lot de fromages selon le plan d'échantillonnage décrit au § I.A. Ces coefficients tiennent donc compte à la fois de l'erreur due à l'échantillonnage (variabilité d'un emplacement à l'autre à la surface du fromage) et de celle due à l'analyse microbiologique. Le plan d'échantillonnage choisi (récolte de la morge sur une surface de 600 cm² répartie sur 4 fromages) nous permet en général d'obtenir des coefficients de variation satisfaisants (moins de 30 %), hormis pour la flore à Gram négatif ; cependant, pour des raisons pratiques, nous n'avons pas voulu augmenter la quantité de morge récoltée.

TABLEAU 1

Variabilité du niveau de la flore microbienne des échantillons prélevés en différents sites de la surface des fromages
Variation of the microbial flora level of samples taken on different areas of the cheese wheel surface

Groupe microbien	Coefficient de variation de reproductibilité * (en %)
Flore à Gram négatif	42,2
Levures	25,6
Colonies orange opaques	17,5
Colonies non pigmentées	11,2
Colonies jaunes opaques	29,7

* Coefficient de variation de reproductibilité du niveau de la flore des échantillons de morge récoltés selon le plan d'échantillonnage décrit au § I.A. Ce coefficient a été établi à partir de l'analyse de 20 prélèvements en double sur 20 lots de fromages.

La figure 1 présente l'évolution, pour les fabrications A à F, de la flore microbienne « totale », de la flore microbienne halotolérante, des levures et de la flore à Gram négatif. Pour ne pas alourdir la figure, l'intervalle de confiance des résultats des dénombrements n'a pas été représenté. Les courbes, pour la flore « totale » et les trois autres groupes microbiens, ont des évolutions sensiblement parallèles d'une fromagerie à l'autre. La flore microbienne s'implante très rapidement à la surface des fromages à un niveau très élevé (environ 10¹⁰ micro-

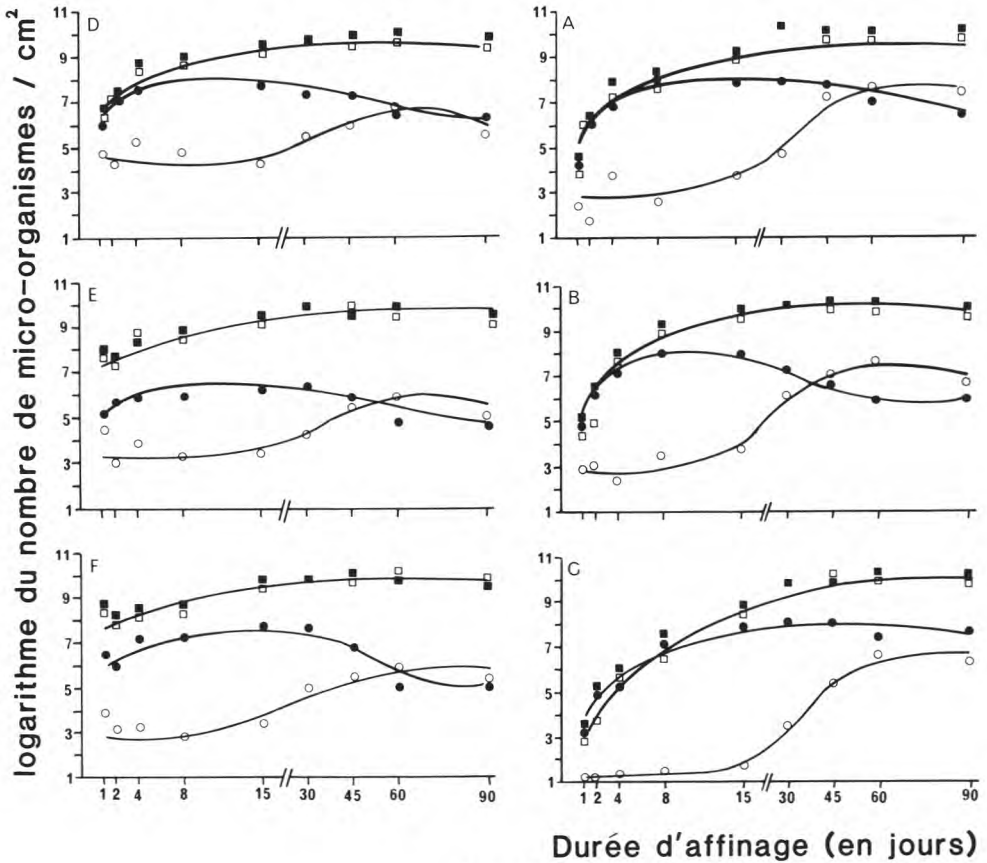


Fig. 1

Évolution, au cours de l'affinage, de la flore microbienne de surface du Comté dans six fabrications (A à F)

- : « flore totale » sur milieu au lactate
- : flore halotolérante sur milieu MSA
- : levures
- : flore sur milieu au cristal violet

Evolution of the surface microbial flora of Comté cheese made in six manufactures (A to F)

- : total flora enumerated on lactate medium
- : salt tolerant flora on buffered Mannitol Salt Agar
- : yeasts
- : flora enumerated on Nutrient Agar supplemented with Crystal Violet

organismes/cm² croûte). Ce niveau maximum est atteint généralement vers 15 j d'affinage ; cependant, pour les fabrications A et surtout C, la croissance microbienne semble plus lente, et ce niveau n'est atteint qu'au bout de 30 j. Le niveau des levures récoltées par unité de surface se stabilise au bout d'une semaine d'affinage vers 10⁸/cm², sauf pour la fabrication E où ce niveau n'atteint que 10⁶ levures/cm² environ ; cette population subit ensuite un déclin à partir du 30^e jour

d'affinage. D'autre part, nous avons mis en évidence l'existence d'une flore capable de croître en présence de cristal violet, à des niveaux atteignant 10^7 micro-organismes/cm² en fin d'affinage (fabrications A, B, C et D). Contrairement à la flore halotolérante et aux levures, cette flore très homogène sur la base de l'aspect des colonies, s'installe assez tardivement : vers le 30^e jour d'affinage, soit à l'entrée en cave chaude chez l'affineur.

A partir de 15 à 30 j d'affinage, il n'existe plus de différence significative (à $P = 0,05$) entre les nombres de micro-organismes obtenus sur milieu au lactate et sur milieu de Chapman. La flore halotolérante constitue alors l'élément dominant de la flore de surface du Comté tandis que les levures et la flore à Gram négatif représentent moins de 1 % de la flore totale. Pour chaque stade au-delà de 15 à 30 j d'affinage, nous avons calculé la moyenne des résultats obtenus sur milieu au lactate et sur milieu de Chapman pour avoir une plus grande précision ; on a regroupé les nombres de colonies non pigmentées (types B et D) car, sur le milieu au lactate, il est difficile de distinguer les colonies opaques des colonies translucides. Cela nous a permis tout d'abord d'observer que les niveaux des populations bactériennes de chaque groupe pigmentaire se stabilisent à partir de 15 à 30 jours d'affinage. En outre, sur le tableau 2, on note que l'effet « fromagerie » sur le niveau de chaque groupe pigmentaire n'est significatif que pour les colonies orange ($P < 0,05$) ; toutefois, la différence entre fromageries reste assez faible : moins de 0,7 unité log. Enfin, la flore dominante est constituée de bactéries non pigmentées et, à un niveau légèrement inférieur, de bactéries orange ; les colonies jaunes opaques sont toujours en nombres nettement plus faibles.

TABLEAU 2

*Niveau de la flore bactérienne halotolérante
(culture sur milieu Mannitol Salt Agar)
à la surface des fromages*

*Level of the salt tolerant bacterial flora on the surface cheese
(enumeration on buffered Mannitol Salt Agar)*

Fromagerie	N ^(a)	Flore halotolérante		
		Non pigmentée	Orange	Jaune
A	4	9,98 ± 0,14 ^(b)	9,32 ± 0,27	8,54 ± 0,35
B	5	9,66 ± 0,34	9,20 ± 0,09	8,47 ± 0,42
C	4	9,79 ± 0,19	9,61 ± 0,20	8,54 ± 0,16
D	5	9,50 ± 0,12	8,90 ± 0,19	8,41 ± 0,43
E	5	9,56 ± 0,21	8,87 ± 0,31	8,23 ± 0,17
F	5	9,68 ± 0,16	8,80 ± 0,27	8,06 ± 0,30

(a) Nombre d'échantillons ayant servi pour le calcul de la moyenne.

(b) Moyenne logarithmique du nombre de bactéries par cm² de fromage entre 15 et 90 jours d'affinage ± intervalle de confiance à $P = 0,95$.

B. Caractérisation des souches isolées

Le tableau 3 présente les résultats de l'étude des souches isolées du milieu MSA. Presque toutes les souches appartenant aux *Micrococcaceae* acidifient le milieu MSA, sauf celles du groupe C (jaunes opaques). D'une façon générale,

TABLEAU 3

Caractérisation primaire des souches isolées du milieu Mannitol Salt Agar tamponné
Primary characterization of strains isolated from buffered Mannitol Salt Agar

Type colonies	Groupe microbien	N *	Pourcentage de souches		
			Avant 15 jours	Après 45 jours	Acidification MSAT **
Orange opaque	<i>Micrococcaceae</i>	1	0,4	0	100
	Corynéformes	204	29,9	41,7	0
Non pigmentées	<i>Micrococcaceae</i>	36	12,9	0	100
	Corynéformes	292	52,9	50,0	3
Jaunes opaques	<i>Micrococcaceae</i>	17	1,4	4,5	0
	Corynéformes	18	2,5	3,8	0

* Nombre de souches.

** MSAT : milieu Mannitol Salt Agar tamponné.

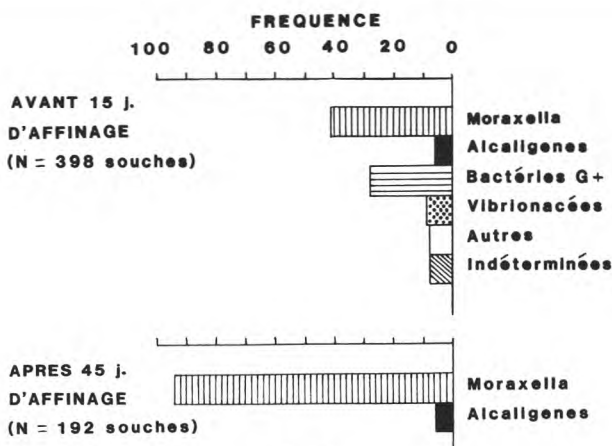


Fig. 2

Fréquence des principaux groupes de micro-organismes résistant au cristal violet isolés de la surface du Comté avant 15 et après 45 jours d'affinage.

Most frequent groups of micro-organisms isolated from the surface of Comté cheese before 15 and after 45 days of the ripening period, on Nutrient Agar supplemented with Crystal Violet.

Micrococcaceae et bactéries corynéformes sont sensibles à la pénicilline et résistantes à l'acide nalidixique. Par ailleurs, les bactéries corynéformes du groupe A produisent une teinte rouge au contact d'une solution de soude, comme les souches apparentées à *Brevibacterium linens*. La flore halotolérante de la morge du Comté appartient uniquement à ces deux grands groupes de micro-organismes, les *Micrococcaceae* et les bactéries corynéformes ; il est intéressant de noter que les coques non pigmentés ont été isolés essentiellement dans la fromagerie C. D'autre part, hormis pour les souches jaunes opaques, les bactéries corynéformes constituent la flore dominante en fin d'affinage.

La figure 2 présente les pourcentages de micro-organismes isolés du milieu au cristal violet appartenant aux principaux groupes trouvés. On constate que près de 40 % des souches, en début d'affinage, et 95 %, en fin d'affinage, appartiennent au genre *Moraxella* ; on observe également la disparition des autres groupes de micro-organismes, sauf les souches appartenant au genre *Alcaligenes* qui restent cependant nettement sous-dominantes par rapport aux souches de moraxelles.

III. Discussion et conclusions

Notre étude sur la flore microbienne du Comté confirme les observations faites par ACCOLAS *et al.* (1978) sur le Comté et le Beaufort et par BLANC *et al.* (1983) sur le Gruyère suisse, à savoir qu'on observe une implantation très rapide de la flore à son niveau maximum, avec une succession levures/bactéries. Nous n'avons pas identifié les levures mais d'après ACCOLAS *et al.* (1978), elles appartiennent aux genres les plus fréquemment mis en évidence dans les fromages : *Candida*, *Kluyveromyces*, *Debaryomyces* et *Rhodotorula*. Le développement très rapide des levures à la surface des fromages après le salage n'est pas un caractère propre au Gruyère de Comté ; on a constaté cette croissance pour beaucoup d'autres types de fromages (KELLY, 1937 ; LENOIR, 1963, DEVOYOD et SPONEM, 1970 ; RICHARD, 1984). Outre une remontée rapide du pH, il est généralement admis que cette population apporte les facteurs nécessaires à la croissance bactérienne, comme cela a déjà été montré pour *B. linens* (PURKO *et al.*, 1951) ou pour des lactobacilles (DEVOYOD et DESMAZEAUD, 1971).

Les moisissures ne représentent qu'un élément mineur de la flore microbienne de la morge du Comté, ces résultats confirmant ceux des auteurs précédents. Le développement limité de ces micro-organismes peut aisément être expliqué par les salages et frottages répétés de la croûte ; en effet, ces soins détruisent périodiquement les colonies naissantes de moisissures et les mettent ainsi en compétition avec des micro-organismes à croissance plus rapide (STADHOUDERS et LANGEVELD, 1966). La décroissance des levures après 30 j d'affinage est sans doute liée aux mêmes raisons ; à partir de ce stade, les conditions à la surface du fromage (de pH en particulier) permettent alors une croissance très rapide des bactéries. D'autre part, on peut également évoquer la production, par certaines souches de *B. linens*, de méthaneéthiol qui a la propriété d'inhiber certaines souches de moisissures (LEWIS, 1980).

Dans notre étude, on notera cependant des divergences quantitatives par rapport aux résultats d'ACCOLAS *et al.* (1978) et de BLANC *et al.* (1983), en particulier sur les niveaux atteints par la flore totale et/ou par les levures : ces auteurs ont

obtenu des résultats en moyenne de 10 à 100 fois inférieurs à ceux de notre étude. Ces différences sont assez délicates à expliquer mais pourraient résulter de modes de prélèvement, de conditions de préparation des échantillons et de milieux de culture différents.

Les différences quantitatives et qualitatives de la flore microbienne se développant à la surface du Comté de diverses origines semblent peu importantes, contrairement à ce qui a été observé pour d'autres fromages (LENOIR, 1963 ; RICHARD et ZADI, 1983). Cela peut signifier que cette flore est assez peu dépendante des variations des facteurs du milieu (température, hygrométrie...) ou de celles des soins en cave (fréquence et qualité, âge des fromages lors des premiers soins). Très vite, une flore bactérienne halotolérante composée essentiellement de bactéries corynéformes domine et se stabilise à son niveau maximum avec des proportions identiques de chaque groupe pigmentaire. Cependant, des changements dans la nature de la flore ne sont pas à exclure, comme cela a été observé pour de nombreux groupes de micro-organismes dans les fromages (LENOIR et AUBERGER, 1966 ; KIKUCHI, 1966 ; MOURGUES *et al.*, 1977 ; RICHARD, 1984). Les courbes observées résulteraient alors de la superposition de plusieurs courbes en cloche (croissance et déclin plus ou moins accentués) des types bactériens constituant la flore totale. De même, il est possible que les propriétés biochimiques et/ou physiologiques des micro-organismes soient différentes d'une fromagerie à l'autre ou d'une cave d'affinage à l'autre.

La flore de surface du Comté est également caractérisée par l'absence de bactéries à Gram négatif, hormis les moraxelles. Les teneurs très élevées en sel à la surface en sont probablement la cause ; d'après ACCOLAS *et al.* (1978), ces teneurs varient entre 12-13 % juste après le salage et 3-4 % juste avant le salage suivant, voire 1 % sur les jeunes fromages. Le niveau de la flore à Gram négatif semble aussi varier de façon importante d'un emplacement à l'autre à la surface des fromages ; nous avons attribué cette variabilité à une sensibilité marquée de ces micro-organismes aux variations ponctuelles des conditions de milieu en surface (Aw, pH, disponibilité en nutriments). La présence de moraxelles à la surface des fromages a déjà été signalée pour le camembert (RICHARD et ZADI, 1983) ; par contre, à l'inverse des souches du Comté, elles ont été isolées du milieu MSA et à des niveaux comparables à ceux des bactéries corynéformes. Les moraxelles de ces deux types de fromages n'ont pas les mêmes caractéristiques physiologiques. C'est le cas par exemple pour leurs températures de croissance : les souches isolées du camembert sont capables de se multiplier à des températures de 12-13 °C ; celles isolées du Comté ne semblent croître qu'à des températures nettement plus élevées puisque leur développement n'intervient qu'à l'entrée en cave chaude (17-18 °C).

L'étude que nous avons entreprise n'est évidemment pas complète ; elle sera poursuivie par des prélèvements effectués dans un plus grand nombre de fromageries. Cependant, il semble qu'avec des techniques assez simples, les fromagers aient réussi à créer un milieu écologique stable. Il nous paraît particulièrement utile d'étudier l'écologie de ces micro-organismes de la morge, en particulier les effets de facteurs intrinsèques comme le pH, l'humidité ou la salinité ou de facteurs extrinsèques comme la température, ou encore le rôle des interactions entre micro-organismes. Mais il serait également intéressant de préciser le rôle, direct et indirect, de cette microflore halotolérante par rapport à celui de la flore interne, au cours de l'affinage des fromages. Ces deux flores sont en effet en nombres sen-

siblement identiques dans le fromage ; mais la flore de surface, « concentrée » sur un faible espace, toujours remaniée par les frottements et soumise à des conditions de croissance assez difficiles, a certainement un rôle différent de celui de la flore interne.

Reçu le 23 décembre 1987

Accepté pour publication le 29 avril 1988.

Références bibliographiques

- ACCOLAS J.P., 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 J.O., MARTIN B., JIMENO J., 1983. Échanges gazeux à la surface du fromage de gruyère en cours de maturation. *Schweiz. Milchw. Forsch.*, 12, 30-34.
- BOURLIOUX P., BARC M.C., 1978. Étude comparative du dénombrement de la flore cutanée par la méthode de Williamson et Kligman et par ponction biopsique en utilisant comme modèle la souris Hairless. *Rev. Inst. Past. Lyon*, 11, 469-479.
- BUCK J.D., 1982. Non staining (KOH) method for determination of Gram reaction of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 992-993.
- COUSINS C.M., 1963. Methods for the detection of survivors on milk handling equipment with reference to the use of disinfectant inhibitors. *J. Appl. Bacteriol.*, 26, 376-386.
- CROMBACH W.H.J., 1974. Morphology and physiology of coryneform bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40, 361-376.
- DASEN A., PITON C., GRAPPIN R., GUERRY P., 1987. Évaluation de la technique DEFT associée à un comptage visuel ou à un comptage par analyseur d'image pour la numération de la flore totale du lait cru. *Lait*, 67, 77-95.
- DEVOYOD J.J., SPONEM D., 1970. La flore microbienne du fromage de Roquefort. VI. Les levures. *Lait*, 50, 524-543.
- DEVOYOD J.J., DESMAZEAUD M., 1971. Les associations microbiennes dans le fromage de Roquefort. III. Action des entérocoques et des levures fermentant le lactose vis-à-vis des lactobacilles. *Lait*, 51, 399-415.
- DUMONT J.P., ROGER S., ADDA J., 1975. Mise en évidence d'un composé à hétérocycle azoté responsable d'un défaut d'arôme dans le gruyère de Comté. *Lait*, 55, 479-487.
- DUMONT J.P., ADDA J., ROUSSEAU 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.
- FAVERO M.S., MCDADE J.J., ROBERTSEN J.A., HOFFMAN R.K., EDWARDS R.W., 1968. Microbiological sampling of surfaces. *J. Appl. Bacteriol.*, 31, 336-343.
- GABY W.L., HADLEY C., 1957. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 74, 356-358.
- GILCHRIST J.E., CAMPBELL J.E., DONNELLY C.B., PEELER J.T., DELANEY J.M., 1973. Spiral plate method for bacterial determination. *Appl. Microbiol.*, 25, 244-252.
- HOLDING A.J., SHEWAN J.M., 1974. *Alcaligenes*. In : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., R.E. BUCHANAN & N.E. GIBBONS, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, 273-277.
- JONES D., WATKINS J., ERICKSON S.K., 1973. Taxonomically significant colour changes in *Brevibacterium linens* probably associated with a carotenoid-like pigment. *J. Gen. Microbiol.*, 77, 145-150.
- KELLY C.D., 1937. The microbiological flora on the surface of limburger cheese. *J. Dairy Sci.*, 20, 239-246.
- KIKUCHI T., 1966. Observation on Camembert cheese ripening. *17th Int. Dairy Congr.*, D, 313-319.

- LENOIR J., 1963. La flore microbienne de Camembert et son évolution au cours de la maturation. *Lait*, 43, 262-270.
- LENOIR J., AUBERGER B., 1966. Contribution à l'étude de la flore microbienne du fromage de type Camembert. *17th Int. Dairy Congr.*, D, 595-602.
- LEWIS B.A., 1980. A study of the antifungal agent(s) produced by four strains of *Brevibacterium*. University of Southern Mississippi, PhD.
- LOWIS M.J., 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.
- MEYER J., CASEY M., GRUSKOUNJAK J., 1985. Diffusion des peptidases dans le gruyère. *Schweiz. Milchw. Forsch.*, 14, 11-15.
- MOURGUES R., VASSAL L., AUCLAIR J., MOCQUOT G., VANDEWEGHE J., DESCHAMPS N., 1977. Origine et développement des bactéries coliformes dans les fromages à pâte molle. *Lait*, 57, 131-149.
- MULDER E.G., ANTHEUNISSE J., 1963. Morphologie, physiologie et écologie des *Arthrobacter*. *Ann. Inst. Past.*, 105, 46-74.
- MULDER E.G., ADAMSE A.D., ANTHEUNISSE J., DEINEMA M.H., WOLDENDORP J.W., ZEVENHUIZEN L.P.T.M., 1966. The relationship between *Brevibacterium linens* and bacteria of the genus *Arthrobacter*. *J. Appl. Bacteriol.*, 29, 44-71.
- PARK R.W.A., HOLDING A.J., 1966. Identification of some common Gram negative bacteria. *Lab. Pract.*, 15, 1124-1127.
- PETTIPHER G.L., MANSELL R., MCKINNON C.H., COUSINS C.M., 1980. Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 423-429.
- PURKO M., NELSON W.O., WOOD W.A., 1951. The associative action between certain yeasts and *Bacterium linens*. *J. Dairy Sci.*, 34, 699-705.
- 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.
- RICHARD J., 1984. Évolution de la flore microbienne à la surface des camemberts fabriqués avec du lait cru. *Lait*, 64, 496-520.
- RICHARD J., ZADI H., 1983. Inventaire de la flore bactérienne dominante des camemberts fabriqués avec du lait cru. *Lait*, 63, 25-42.
- RICHARD J., MOLLER ANDERSEN H., GRATADOUX J.J., 1983. Rapid method for selecting appropriate solid media for the enumeration of aerobic micro-organisms. *J. Appl. Bacteriol.*, 54, 329-334.
- RICHARD J., PITON C., 1986. Semi-log model for interpreting the results of swabbing surfaces naturally contaminated. *J. Appl. Bacteriol.*, 60, 243-249.
- REYN A., 1974. Gram negative cocci and coccobacilli. *Neisseriaceae*. In : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., R.E. BUCHANAN & N.E. GIBBONS, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, 427-444.
- ROGOSA M., CUMMINS C.S., LELLIOTT R.A., KEDDIE R.M., 1974. Actinomycetes and related organisms. Coryneform group of bacteria. In : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., R.E. BUCHANAN & N.E. GIBBONS, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, 599-632.
- SHEWAN J.M., VERON M., 1974. Gram negative facultatively anaerobic rods. The *Vibrionaceae*. In : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., R.E. BUCHANAN & N.E. GIBBONS, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, 340-352.
- STADHOUDERS J., LANGEVELD L.P.M., 1966. The microflora of the surface cheese. Factors affecting its composition. *17th Int. Dairy Congr.*, D, 577-584.
- STRAKA R.P., STOKES J.L., 1957. Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. *Appl. Microbiol.*, 5, 21-25.