

Comportement de *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* dans les fromages de chèvre au lait cru

F. MORGAN (1), V. BONNIN (1), A. MEYRAND (2), C. MAZUY (2), M.P. MALLEREAU (3), G. PERRIN (3), C. VERNOZY-ROZAND (2)

(1) ITPLC, Institut Technique des Produits Laitiers Caprins, BP 49, 17000 Surgères

(2) ENV Lyon, Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, 1 avenue Bourgelat, BP 83, 69280 Marcy l'Etoile

(3) AFSSA - Laboratoire de Recherche Caprine, 60 rue Pied de Fond, BP 3081, 79012 Niort

RESUME. - Des fromages de chèvre ont été fabriqués à partir de lait cru volontairement ensemencé avec différents inoculums de *Staphylococcus aureus* ou *Listeria monocytogenes*. Deux types de technologies - lactique et présure - ont été employées. Les paramètres physico-chimiques et microbiologiques des caillés et des fromages ont été déterminés à toute les étapes de la fabrication, de l'affinage et du stockage. Le comportement des bactéries pathogènes a été étudié par une recherche qualitative et un dénombrement des germes, et la production d'entérotoxine par *S. aureus* a également été mesurée.

Les résultats indiquent que le nombre de *S. aureus* décroît régulièrement au cours de l'affinage et de la conservation des fromages lactiques jusqu'à la disparition complète du germe au cours du stockage des fromages. En revanche, le nombre de *S. aureus* reste stable pendant l'affinage des fromages issus d'une technologie présure. La production d'entérotoxine est corrélée à la taille de l'inoculum de départ, et de l'entérotoxine a été détectée dans les fromages lactiques pour lesquels *S. aureus* avait disparu.

Les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques des fromages de chèvre lactiques conduisent à une diminution du nombre de *L. monocytogenes* au cours de l'affinage et de la conservation. Toutefois, cette diminution ne conduit pas à la disparition totale de la bactérie pathogène.

Behaviour of *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cheeses made from raw goat milk

F. MORGAN (1), V. BONNIN (1), A. MEYRAND (2), C. MAZUY (2), M.P. MALLEREAU (3), G. PERRIN (3), C. VERNOZY-ROZAND (2)

(1) ITPLC, Institut Technique des Produits Laitiers Caprins, BP 49, 17000 Surgères

(2) ENV Lyon, Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, 1 avenue Bourgelat, BP 83, 69280 Marcy l'Etoile

(3) AFSSA - Laboratoire de Recherche Caprine, 60 rue Pied de Fond, BP 3081, 79012 Niort

SUMMARY. - Soft goat cheeses were manufactured with raw milk inoculated with various levels of *Staphylococcus aureus* or *Listeria monocytogenes*. Two technological schemes - lactic and rennet - were followed. For curds and cheeses, the physico-chemical and microbiological parameters were determined after each processing steps as well as during ripening and storage. The behaviour of the pathogenic germs was followed using a qualitative detection and plating procedures, and the enterotoxin production of *S. aureus* was also determined.

The results show that the number of *S. aureus* decrease regularly during ripening and storage of lactic cheeses, leading to a complete disappearance of the pathogenic germ during storage. On the contrary, the number of *S. aureus* remains stable during ripening and storage of cheeses made according to a rennet technology. The enterotoxin production is correlated with the size of the inoculum, and enterotoxin was detected even in cheeses where *S. aureus* has disappeared.

The physico-chemical and microbiological characteristics of lactic cheeses cause a decrease of the number of the *L. monocytogenes*. However, this decrease does not lead to the complete disappearance of the pathogenic bacteria.

INTRODUCTION

Au cours de la fabrication, de l'affinage et de la conservation des fromages au lait cru, le comportement des micro-organismes – utiles ou pathogènes – est fortement lié aux paramètres technologiques tels que la nature et l'activité des ferments lactiques, la vitesse et le niveau d'acidification du caillé et la conduite de l'affinage (durée, température, humidité).

Les fromages de chèvre peuvent être fabriqués selon deux types de technologies : lactique (fromages de type crottins ou bûchettes) et présure (fromages de type chèvre-boîte). La technologie lactique comprend une phase de coagulation lente qui conduit à une forte acidification. La technologie présure implique quant à elle une coagulation très rapide, mais un niveau d'acidification plus faible. Ces spécificités technologiques doivent être prises en compte pour étudier et comprendre le comportement des micro-organismes pathogènes dans les fromages de chèvre au lait cru.

Bien que de nombreux travaux aient été menés sur le développement des germes pathogènes dans les fromages au lait de vache, il est difficile de transposer les résultats obtenus au cas des fromages de chèvre.

Dans ce contexte, notre objectif était d'étudier le comportement de *Staphylococcus aureus* et de *Listeria monocytogenes* – deux germes pathogènes majeurs – dans les fromages de chèvre au lait cru, fabriqués selon les technologies lactique et présure.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. SOUCHES DE BACTÉRIES PATHOGÈNES

1.1.1. *Listeria monocytogenes* :

- isolée de lait de chèvre
- inoculums testés : 10^4 et 10^5 UFC/mL en technologie lactique

1.1.2. *Staphylococcus aureus* :

- *S. aureus* subsp. *aureus* 4890 1 A
- isolée de fromage de vache
- productrice d'entérotoxine A
- inoculums testés : 10^4 , 10^5 et 10^6 UFC/mL en technologies lactique et présure (Meyrand et al., 1998 ; Vernozy-Rozand et al., 1998)

1.2 FABRICATIONS FROMAGÈRES ET ÉCHANTILLONNAGE

Le lait de chèvre utilisé pour les fabrications fromagères était de bonne qualité hygiénique (germes et cellules somatiques) et ne contenait pas de germes pathogènes. Les schémas technologiques utilisés pour la fabrication des fromages de type « bûchettes » (technologie lactique) et « chèvre boîte » (technologie présure) sont données Figure 1. Les starters utilisés étaient des ferments mésophiles en technologie lactique (LD1, Chr. Hansen) et un mélange de ferments mésophiles (LD2, Chr. Hansen) et thermophiles (TAO52, Texel) en technologie présure. Les ferments d'affinage utilisés étaient KL 71 et Geo 15 (Texel) en technologie lactique et HP 6 et Geo 13 (Texel) en technologie présure.

Les différents inoculums de bactéries pathogènes étaient ajoutés au lait en même temps que les starters et les ferments d'affinage.

Deux séries de fabrications étaient réalisées pour chaque inoculum, et des fromages témoins étaient également fabriqués à partir de lait non contaminé.

Les analyses étaient effectuées sur les laits après ensemencement, à divers moments au cours de la fabrication (caillés, sérums), en cours d'affinage des fromages (~ 6 jours) et pendant la durée de conservation (S+2, S+3, S+4, S+5, S+6). Pour les fromages, les dénombrements bactériens étaient réalisés séparément pour la surface et le cœur des fromages. La surface était grattée à plusieurs endroits et les différents échantillons obtenus étaient regroupés pour l'analyse. Le cœur des fromages était prélevé selon la technique de Law et al. (1973).

1.3. ANALYSES BACTÉRIOLOGIQUES

La flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR) était dénombrée selon les procédures standard sur milieu PCA (Plate

Count Agar) après incubation 72h à 30°C (FIL-IDF 100B :1991).

Le dénombrement des *L. monocytogenes* était réalisé sur milieu PALCAM et une recherche qualitative était également effectuée selon la norme AFNOR NF V 08-055.

Le dénombrement des *Staphylococcus aureus* était effectué selon la méthode FIL (FIL-IDF 145 :1990).

Figure 1
Schémas technologiques
pour la fabrication des fromages de chèvre.

Technologie lactique	Technologie présure
Lait cru de chèvre (24 °C)	Lait cru de chèvre (34°C)
Ajout des starters et des ferments d'affinage	Ajout des starters et des ferments d'affinage
Emprésurage à pH 6.4 (5 ml / 100 l)	Emprésurage à pH 6.4 (30 ml / 100 l)
Acidification - Coagulation (22-24h, 24°C)	Coagulation (40 min., 34°C)
Moulage à la louche	Moulage
Égouttage (20-22h, 24°C, 2 retournements)	Tranchage du caillé
Refroidissement (12h, 4°C)	Égouttage (20h, 18-25°C, 3 retournements)
Salage en saumure (7 min., 13°C)	Salage en saumure (15 min., 10°C)
Ressuyage (24 h, 14°C, 90 % R.H.)	Ressuyage (12 h, 14°C, 90 % R.H.)
Affinage (10-13 jours, 13 °C, 97 % R.H.)	Affinage (11 jours, 12 °C, 97 % R.H.)
Emballage	Emballage
Stockage (jusqu'à 42 jours, 4°C)	Stockage (jusqu'à 42 jours, 4°C)

La détection de l'entérotoxine A était réalisée selon les techniques décrites par Vernozy-Rozand et al. (1998) et Meyrand et al. (1998). L'appareil Vidas Set (BioMérieux) était utilisé pour la recherche qualitative et une méthode ELISA était utilisée pour le dosage quantitatif de l'entérotoxine (Lapeyre et al., 1988).

1.4. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES

Les analyses suivantes ont été effectuées : extrait sec (ES) après un séchage à 102 °C jusqu'à poids constant, pH, acidité Dornic, chlorures (norme AFNOR NF V 04-288).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

2.1. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES FROMAGES

Les paramètres physico-chimiques des fromages de chèvre étaient identiques quelque soient les conditions expérimentales (technologie mise en œuvre, fromages témoins ou contaminés). Le tableau 1 montre des valeurs moyennes.

2.2. ÉVOLUTION DE LA FLORE TOTALE

Quelles que soient les conditions expérimentales (technologie mise en œuvre, fromages témoins ou contaminés), une évolution similaire de la FMAR au cours de la fabrication, de l'affinage et de la conservation des fromages de chèvre était observée. Des profils typiques décrivant cette évolution sont montrés sur la figure 2. Les laits de départ comprenaient moins de 10^5 UFC/mL, la population bactérienne maximum était atteinte dans les caillés au démoulage. Pendant la conservation, la FMAR se stabilisait autour de 10^8 UFC/g en surface des fromages et autour de 5×10^7 UFC/g au cœur des fromages.

2.3. COMPORTEMENT DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS

La population de *S. aureus* dans les caillés au démoulage (premiers points de la Figure 3) était environ 10 fois supérieure à

celle du lait inoculé, quel que soit le niveau d'inoculation. Cette augmentation est vraisemblablement due à une concentration des germes retenus dans le coagulum, plutôt qu'à un développement pendant la coagulation et l'égouttage.

Tableau 1
Paramètres physico-chimiques moyens
des fromages de chèvre.

	Technologie Lactique (n=12)						
	Caillé	Age des fromages (jours)					
		5	12	21	28	35	42
ES (%)	38,1	40,3	48,0	51,1	52,0	55,4	56,4
NaCl (%) *	0,12	1,6	1,9	2,3	2,4	2,4	2,3
pH surface	4,40	4,54	5,39	5,73	6,25	6,26	6,64
pH cœur	4,40	4,41	4,58	4,72	5,07	5,22	5,38

	Technologie Présure (n=10)						
	Caillé	Age des fromages (jours)					
		6	13	20	27	34	41
ES (%)	51,5	53,2	54,4	56,5	57,0	57,6	58,0
NaCl (%) *	0,12	1,6	1,6	1,7	1,7	1,8	1,8
pH surface	6,35	6,50	7,05	7,11	7,17	7,29	7,33
pH cœur	6,35	5,62	6,20	6,41	6,55	6,70	6,75

* : % de NaCl dans l'humidité des fromages

Figure 2
Evolutions moyennes de la FMAR dans les fromages
de chèvre (cœur : ligne pleine ; surface : ligne pointillée).

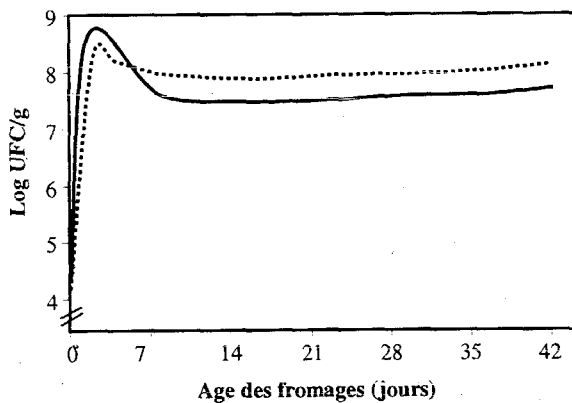
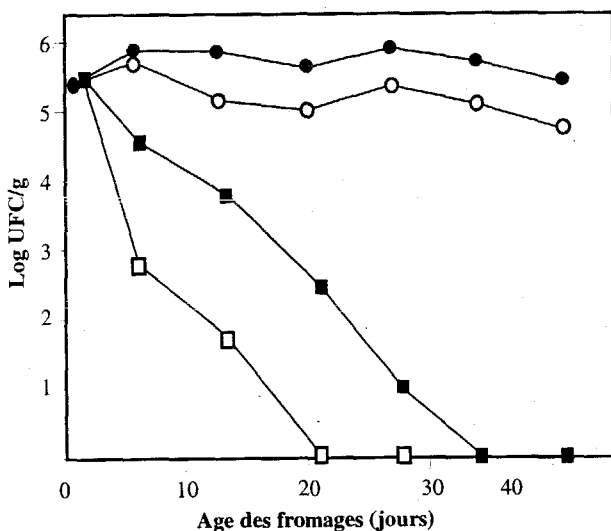


Figure 3
Evolution de la population en *S. aureus*
(inoculum 10^4 UFC/mL) des fromages de chèvre au cours
de la fabrication, de l'affinage et de la conservation.
Technologie lactique : cœur (■) et surface (□).
Technologie présure : cœur (●) et surface (○).



Pour les fromages « présure », la population en *S. aureus* reste stable et élevée tout au long de l'affinage des fromages et de leur conservation (fig. 3).

En revanche, pour les fromages lactiques, le nombre de *S. aureus* diminuait après l'égouttage jusqu'à disparaître pendant la conservation (fig. 3).

Les différences d'évolution de la population *S. aureus*, observées entre les fromages issus des technologies lactiques et présures, peuvent être reliées aux caractéristiques biochimiques et microbiologiques de ces fromages. Les fromages lactiques, avec une forte activité des bactéries lactiques, un pH plus bas, et un taux de NaCl plus élevé (Tableau 1), constituent un milieu défavorable à la croissance du germe pathogène.

Pour les deux types de technologies, le nombre de *S. aureus* en surface des fromages est inférieur à celui trouvé au cœur. Cela peut être dû à une flore totale plus nombreuse à la surface des fromages (Figure 2), qui rentre en compétition avec *S. aureus*.

L'impact des différentes technologies sur la production d'entérotoxine A est montré par le tableau 2.

La toxine n'a jamais été détectée dans les fromages témoins.

Dans les fromages inoculés, la concentration en entérotoxine A pouvait atteindre 2,5 ng/g dans les fromages lactiques et 3,2 ng/g dans les fromages « présure » (exemple à 35 jours de conservation donné tableau 2). La production d'entérotoxine était plus tardive et moins importante pour les fromages lactiques, ce qui peut s'expliquer par un plus faible nombre de *S. aureus* dans ces fromages et par une inhibition due aux starters lactiques. Néanmoins, de l'entérotoxine a été détectée dans les fromages lactiques pour lesquels *S. aureus* avait disparu.

Enfin, le niveau de production d'entérotoxine était fortement corrélé à la taille de l'inoculum de départ et la toxine était détectée avec un inoculum initial de 10^4 UFC/mL.

Tableau 2
Dosage de l'entérotoxine A dans le fromage de chèvre
après 35 jours de conservation.
Comparaison des technologies lactique et présure.

Niveau de contamination du lait	Techno. lactique		Techno. présure	
	Vidas SET	ELISA (ng/g)	Vidas SET	ELISA (ng/g)
Témoin	-	ND	-	ND
10^4	-	0,5	+	1,3
10^5	+	1,2	+	1,8
10^6	+	2,1	+	3,2

ND : non détecté

2.4. COMPORTEMENT DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Dans les caillés au démoulage, la population en *L. monocytogenes* était environ 10 fois supérieure à celle du lait inoculé. Ce phénomène provient probablement d'une rétention des germes dans le coagulum et non d'un développement bactérien.

Au cours de l'affinage et de la conservation, le nombre de *L. monocytogenes* décroît puis se stabilise autour de 30 UFC/g après 14 jours en surface et après 28 jours au cœur des fromages (inoculum 10^2 UFC/mL, Figure 4). Même pour un inoculum très faible (10 UFC/mL), le germe est toujours détecté après 42 jours au cœur des fromages (Tableau 3).

Ainsi, contrairement aux observations précédentes sur *S. aureus*, la technologie lactique ne permet pas la disparition de *L. monocytogenes* dans les fromages de chèvre. De nombreux travaux ont montré par ailleurs que *L. monocytogenes* peut survivre et même se développer dans des conditions acides, jusqu'à un pH de 4,3 environ (Pitt et al., 1999).

Figure 4
Evolution de la population en *L. monocytogenes*
(inoculum 10^2 UFC/mL) des fromages de chèvre lactiques
(cœur, ■ et surface, □) au cours de la fabrication,
de l'affinage et de la conservation

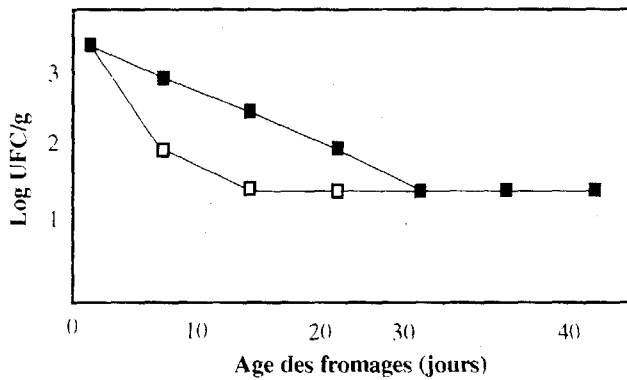


Tableau 3
Recherche qualitative de *L. monocytogenes*
dans les fromages de chèvre lactiques

Age du fromage	Niveau de contamination du lait			
	10^1 UFC/mL		10^2 UFC/mL	
	cœur	surf.	cœur	surf.
2 j. (caillé)		+		+
7 j.	+	+	+	+
14 j.	+	-	+	+
21 j.	+	-	+	+
28 j.	+	-	+	+
35 j.	+	-	+	+
42 j.	+	-	+	+

3. CONCLUSIONS

Concernant *S. aureus*, les résultats indiquent une grande différence de comportement du pathogène dans les fromages lactiques et dans les fromages de type « chèvre-boîte ». D'un point de vue réglementaire, il serait souhaitable, de tenir compte - pour la définition des normes bactériologiques - du type de technologie fromagère mise en œuvre. De plus, la détection d'entérotoxine devrait être incluse dans de telles normes.

Les résultats obtenus montrent que le nombre de *L. monocytogenes* diminue dans les fromages lactiques au cours de l'affinage, sans toutefois conduire à une disparition du pathogène. L'exigence réglementaire est donc dans ce cas parfaitement justifiée.

Lapeyre, C., Janin, F., Kaveri, S.V., 1988. Food Microbiol. 5, 25-31.

Law, B.A., Sharpe, M.E., Mabbitt, L.A., Cole, C.B., 1973. Technical series, Society for Applied Bacteriology, 7, 1.

Meyrand A., Boutrand Loei S., Ray Gueniot S., Mazuy C., Gaspard C.E., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C., Vernozy-Rozand C., 1998. J. Appl. Bacteriol., 85, 525-544.

Pitt, W.M., Harden, T.J., Hull, R.R., 1999. Austr. J. Dairy Technol. 54, 49-65.

Vernozy-Rozand C., Meyrand A., Mazuy C., Delignette-Muller M.L., Jaubert G., Perrin G., Lapeyre C., Richard Y., 1998. J. Dairy Res., 65, 273-281.