

Etude de la croissance de *Staphylococcus aureus* dans le lait et les fromages de chèvre au lait cru

P. LE MENS (1), Y. LEFRILEUX (2), H. TORMO (3), C. VERNZOY-ROZAND (4)

(1) Institut de l'Elevage, 149 rue de Bercy, Paris 12

(2) Station Caprine Expérimentale du Pradel, 07 170 Mirabel

(3) Centre Fromager de Carnejane, 04 170 Le Chaffaut

(4) Unité de Microbiologie Alimentaire et Prévisionnelle, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, 69280, Marcy l'Etoile

RESUME – La croissance de *S.aureus* dans du lait UHT est significative à 32 et 22°C, par contre à 18 et 12°C le temps de latence est long et la croissance très lente. L'acidification du lait cru en début de process semble être un facteur inhibiteur de la croissance de *S.aureus*. Dans le caillé lactique (pH démoulage 4,4) une température de caillage de 18°C associée à une acidification rapide en début de process et un refroidissement du lait permettent de ralentir la croissance de *S.aureus*. Les types de technologies, lactique et présure, se différencient par la cinétique et le niveau final de *S.aureus*.

Staphylococcus aureus's growth in the raw milk and goat cheeses

P. LE MENS (1), Y. LEFRILEUX (2) H. TORMO (3), C.VERNOZY-ROZAND (4)

(1) Institut de l'Elevage, 149 rue de Bercy, Paris 12

SUMMARY – The growth of *Staphylococcus aureus* in ultra high treatment milk is significant at 32°C and 22°C, on the other hand at 18°C and 12 °C, the latent period and the growth are very long. The effect of the raw milk's acidification at the beginning of the process is an inhibitory factor for the growth of *S.aureus*. In the lactic curds (pH turning out 4,4) at 18°C temperature, when the milk is curdled, associate with a quick acidification at the beginning of the process and a milk cooling allow to slow down the growth of *S.aureus*. The types of lactic and rennet technologies differ as for the growth kinetic of *S.aureus*.

INTRODUCTION

La réglementation concernant la qualité microbiologique des fromages au lait cru oblige à rechercher 4 germes dont *Staphylococcus aureus* (considéré comme indicateur d'hygiène). Dans les fromages de chèvre au lait cru cette bactérie est fréquemment mise en évidence lors des contrôles microbiologiques. La réglementation fixe des seuils à ne pas dépasser sur l'échantillon de fromages analysé. Le producteur pourra chercher à se situer dans la plage de tolérance des seuils si un plan de maîtrise des risques est mis en œuvre. La maîtrise de la contamination par *S.aureus* dans ces fromages suppose que tout au long de la chaîne de production, de l'animal jusqu'à l'affinage, les facteurs susceptibles de favoriser la croissance soient connus.

La contamination initiale du lait est fortement influencée par les animaux excréteurs (mammites subcliniques). La contamination est de ce fait très précoce, c'est donc en début de processus qu'il faudra tenter d'agir.

Au delà de la contamination des fromages, c'est la présence d'enterotoxines qui pose problème en matière de santé publique, cela suppose un niveau de contamination élevé, la présence d'une souche entérotoxigène et des conditions favorables à la toxinogénèse.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette communication fait état de quatre expériences réalisées en 1998. Les trois premières concernant la technologie de type lactique ont été réalisées à la station expérimentale du Pradel en Ardèche. La quatrième expérience concerne la technologie de type présure (« caillé doux ») réalisée au Centre Fromager de Carmejane dans les Alpes de Haute Provence. Par souci de clarté nous avons choisi de présenter brièvement le protocole dans la partie résultats de chaque expérience.

L'objectif de ces travaux était de connaître les facteurs favorisant la croissance de *S. aureus* dans les fromages et par là de proposer des moyens de maîtrise.

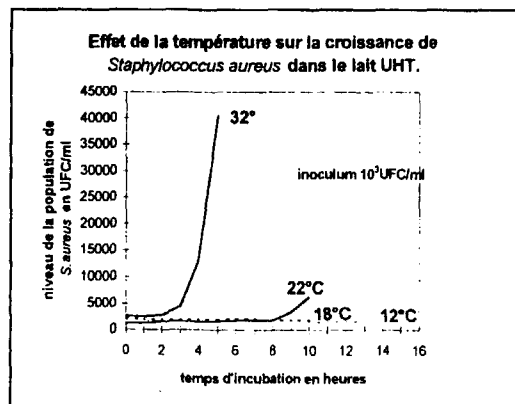
2. RÉSULTATS

2.1 INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE SUR LA CROISSANCE DE *S.AUREUS* DANS LE LAIT (expérience 1)

Du lait de vache UHT a été contaminé avec une souche endogène de *S.aureus* (provenant d'une chèvre infectée) selon 3 niveaux (10^1 , 10^2 , 10^3 UFC / ml) et incubé à quatre températures (12, 18, 22 et 32°C). L'objectif était d'étudier l'influence de la température sur la croissance de *S.aureus* dans du lait en s'affranchissant de la flore de contamination.

L'analyse des résultats montre qu'à 12 et 18°C il n'y a pas de croissance significative, respectivement en 16 et 10 h d'incubation et ceci quelque soit le niveau de contamination initial. En revanche, à 22°C et 32°C, un développement significatif de *S.aureus* est observé pour les trois niveaux (figure 1). Le temps de latence varie avec la température. Plus celle-ci est proche de l'optimum de croissance (37°C) plus le temps de latence est court : 2 h à 32°C, 4 h à 22°C, 10 h à 18°C et supérieur à 16 h à 12°C.

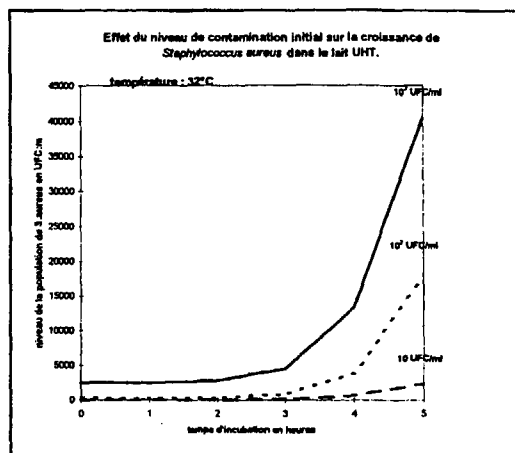
Figure 1



Les trois niveaux de contamination initiaux restent significativement différents au cours du temps quelque soit la température d'incubation (figure 2).

Bien que conduisant à des niveaux de populations microbiennes finales moins élevées que le niveau de contamination initial fort, les niveaux de contamination moyen et faible ont, une fois le temps de latence écoulé, des rythmes de croissance plus élevés.

Figure 2



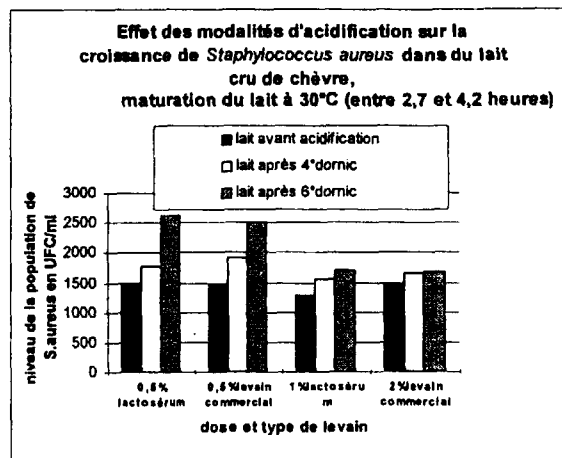
2.2. INFLUENCE DU TYPE ET DE LA DOSE DE LEVAINS LACTIQUES SUR LA CROISSANCE DE *S.AUREUS* DANS LE LAIT ACIDIFIÉ (expérience 2)

Du lait cru de chèvre (trait stérilement - flore totale inférieure à 100 UFC/ml) est ensemencé avec deux levains lactiques (un levain commercial SMADL77 et un levain naturel du lactosérum de fabrication de type lactique). Trois doses de levain ont été utilisées : 0,5 %, 1 % et 2 %. Il a été vérifié que la concentration en bactéries lactiques était proportionnelle au pourcentage de ferments ajoutés au lait (entre 2.10^6 et 15.10^6 UFC/ml de lait). Le lait a été contaminé avec une souche endogène de *S.aureus* selon 2 niveaux (10^2 , 10^3 UFC / ml) et incubé à 30°C. Chaque essai était répété trois fois.

Le dénombrement des staphylocoques dans le lait a été fait quand l'acidité développée était comprise entre 4 et 6°Dornic. L'objectif était d'évaluer la croissance de *S.aureus* dans du lait acidifié en s'affranchissant de la flore endogène du lait cru.

Les résultats montrent que la croissance de *S.aureus* est inhibée par la production d'acide lactique obtenue en 3 à 4 heures d'incubation, ceci pour les deux niveaux de contamination initiale. Lorsque un gain d'acidité de 4°D est atteint, les staphylocoques ne se développent pas de façon significative quelque soit la dose et le type de ferments. Il en est de même lorsque l'acidité atteint + 6°D. Cependant, il semble qu'une faible dose de ferments aurait tendance à faciliter la croissance des ferments ait tendance à faciliter la croissance des staphylocoques par rapport aux fortes doses (figure 3).

Figure 3



L'inhibition des staphylocoques est la même quelque soit le niveau de contamination initiale du lait avant traitement.

2.3. INFLUENCE DES FACTEURS TECHNOLOGIQUES SUR LA CROISSANCE DE *S.AUREUS* DANS LE CAILLÉ LACTIQUE (expérience 3)

Dans cet essai, le plan d'expérience était organisé comme suit :
– contamination du lait par une souche endogène de *S.aureus* selon 3 niveaux (10^1 , 10^2 , 10^3 UFC/ml),

– préparation du lait selon deux modalités : d'une part le lait est incubé 1 h à 30°C aussitôt après la traite, et, d'autre part incubé 2 h à 30°C après la traite,

– acidification du caillé selon deux modalités : d'une part une acidification rapide (10 h après l'emprésurage pH < 5) et d'autre part une acidification lente (10 h après emprésurage pH > 5),

Ces deux modalités permettent d'atteindre dans le caillé un pH final de 4,3 en 24 h de coagulation (c'est le profil de la courbe qui les différencie : profil lent et rapide).

– température de caillage selon 2 niveaux : 18°C et 22°C.

Le lait cru de chèvre était trait stérilement.

L'objectif était d'évaluer la croissance de *S.aureus* dans du caillé en s'affranchissant de la flore endogène du lait cru. Chaque essai a été répété 3 fois.

Les résultats montrent que dans le caillé au bout de 48 h, le nombre de staphylocoques dépend : du niveau de contamination initial, du mode de préparation du lait, de la température de caillage et du profil d'acidification.

Tous traitements confondus, la hiérarchie des trois niveaux de contamination du lait (faible, moyen, fort) est conservée dans le caillé 48 h après l'emprésurage soit respectivement : 935, 13 570 et 90 253 UFC/gramme, ces valeurs sont significativement différentes.

La modalité de préparation du lait 2 h à 30°C est plus favorable à la croissance de *S.aureus* que celle réalisée 1 h après la traite à 30°C, respectivement : 12 023 UFC/g contre 5623 UFC/g pour 1 h à 30°C.

La température de caillage agit sur la contamination à 48 h. Un caillage à 18°C permet de limiter la croissance des staphylocoques par rapport à un caillage à 22°C. Ainsi la contamination obtenue dans le caillé à 48 h est deux fois plus importante à 22°C par rapport à 18°C. Le profil d'acidification influence la croissance dans un rapport de 1 à 2 entre le profil lent et le profil rapide.

Une interaction est observée entre la température de caillage et le mode de préparation du lait. Ainsi, la croissance est favorisée lorsque le lait est incubé pendant 2 h à 30°C puis emprésuré à 22°C. La croissance minimale (3 981 UFC/g) est obtenue en combinant les facteurs suivants : lait refroidi, caillage à 18°C avec 2% de levain. La densité microbienne la plus élevée (22 900 UFC/g) est obtenue en combinant les facteurs suivants : lait non refroidi, caillage à 22°C avec 0,5% de levain.

2.4. CROISSANCE DE *S.AUREUS* DANS LE FROMAGE DE CHÈVRE DE TYPE CAILLÉ DOUX (expérience 4)

Des laits de chèvre issus de 6 troupeaux différents et naturellement contaminés par *S.aureus*, (de 10^1 à 500 UFC/ml), ont permis de fabriquer des fromages de type caillé doux (tome de Provence) en milieu contrôlé. Deux schémas technologiques ont été mis en œuvre, l'un de type « présure » (lait cru emprésuré à 32°C sans ajout de bactéries lactiques), l'autre de type « mixte » (lait cru emprésuré à 32°C avec ajout d'une très faible quantité d'un levain lactique, 0,04 %). Les autres paramètres technologiques étaient identiques pour les deux schémas.

Les résultats montrent que la technologie « mixte » induit des pH significativement plus faibles que la technologie « présure » de J+1 à J+10, respectivement 4,6, 4,84 pour la technologie « mixte », et 5,5, 5,61 pour la technologie « présure ». Par contre à J+20 le pH n'est plus significativement différent, 5,80 et 5,99.

Les dénombrements de staphylocoques ne sont pas différents le premier et le deuxième jour de fabrication, à l'inverse ils sont significativement différents à J+10 et J+20, respectivement pour « mixte » et « présure » : 4,30, 4,52, 3,38 2,62, et

4,06, 4,65, 4,61 4,34 (logN). L'acidification plus rapide du caillé « mixte » (écart de 0,7 unité pH) est un des facteurs expliquant ces différences. L'écart moyen entre la technologie « mixte » et « présure » est de 1,5 log.

Dans les deux schémas de fabrication nous observons une forte croissance les deux premiers jours de la fabrication, ceci dans un rapport de 1 à 100 entre le niveau de contamination du lait et le dénombrement de *S.aureus* à J+2.

Avec ces laits crus naturellement contaminés, il n'a pas été observé d'effet du niveau de contamination initiale.

DISCUSSION ET SYNTHÈSE

La température d'incubation de 32°C influence fortement la croissance de *S.aureus* parce qu'elle se rapproche de 37°C, température optimale pour la croissance de *S.aureus*. Or dans de nombreux schémas technologiques la maturation courte et le caillage se font à cette température. Dans ce cas la maîtrise sanitaire consisterait à diminuer le niveau initial de contamination par un travail en amont sur les mammites subcliniques. En effet la principale cause de contamination du lait cru dans l'espèce caprine, est l'excrétion de *S.aureus* par des mamelles infectées (de Crémoux 1994).

Aux deux températures étudiées 18 et 22°C qui sont les bornes des schémas technologiques nous observons un début de croissance seulement pour le niveau 22°C. Cela donne aux fabricants une possibilité de maîtrise de la croissance de cette bactérie pathogène par le choix de l'emprésurage à 18°C. Un autre aspect de la maîtrise pourra passer par un refroidissement le plus rapide possible après la traite, technique qui a montré son efficacité dans l'expérience n° 3.

A la température de 12°C nous n'avons pas observé de croissance dans du lait UHT 16 h après inoculation. Les données de la littérature indique cependant une température de croissance possible de *S.aureus* à 6°C. La différence entre nos observations et ces travaux porte sur le substrat. Nous avons utilisé du lait UHT de vache contrairement aux études en laboratoires qui portent le plus souvent sur des bouillons de culture. (Jean 1989)

Le rythme de développement plus rapide de *S.aureus* avec cependant un temps de latence plus long pour un niveau faible de contamination a été déjà remarqué par d'autres auteurs en technologie Camembert au lait de vache. (Jean 1989). Ceci indique que même avec un niveau de contamination faible en staphylocoques, on observe une croissance de cette population bactérienne.

L'inhibition de *S.aureus* due à l'acidification du caillé que nous observons dans l'expérience n°2 a été montrée par d'autres auteurs dans la technologie du Saint Nectaire en particulier (Sesquès 1994).

L'expérience n° 4 montre la même tendance dans la tome de Provence ou le contrôle des pH par les producteurs pourrait être un outil efficace de la prévention. La limite de l'inhibition par une baisse de pH tient au fait que les caractéristiques du produit originel risquent d'être modifiées en particulier la texture et le goût des fromages (en référence à l'étude de la tome de Provence). Pour d'autres fromages la limite de cette technique pourrait être rapidement atteinte en raison de certains cahiers des charges qui codifient l'emploi de levains lactiques. La combinaison des différents facteurs inhibiteurs : contamination initiale la plus faible, refroidissement rapide du lait à 18°C, température de caillage de 18°C, gestion et profil d'acidification rapide, permettrait de réduire la croissance de *S.aureus* dans les caillés lactiques de chèvres.

Dans la technologie du caillé doux le pH et la température sont deux facteurs favorables à la croissance de *S.aureus* pendant les premières heures du process (pH variant de 6,6 à 5,8 entre l'emprésurage et la 8^{ème} heure et 32 °c pendant 3 h). Ces deux conditions sont réunies dans de nombreux fromages ce qui explique en partie la contamination des fromages malgré la maîtrise technologique du process. Dans les fromages de types lactiques la croissance de *S.aureus* est également possible pendant les premières heures et ce n'est qu'après une baisse significative du pH (à 10h pH 5) que la croissance est ralentie. Il est possible d'observer pour des faibles niveaux de

contamination une disparition des bactéries dans la phase finale d'affinage, probablement liée à une baisse de l'activité de l'eau et l'activité enzymatique. (Vernozy 1998, Perez 1994).

La même tendance est observée dans des fromages de type pâte molle : croissance dans les premières heures du processus puis dans la phase consécutive au salage, décroissance lente voire nulle (Vernozy et al 1998.)

La limitation du niveau de la population dans le jeune fromage est importante pour gérer le risque de toxogénèse car il a été démontré que deux facteurs étaient indispensables, la biomasse 10^6 UFC/gramme et une souche entérotoxigène (Vernozy 1998). Sur ce second facteur il est difficile d'opérer, mais sur le niveau de population il est possible d'agir par les éléments mis en évidence dans nos expériences sans oublier la maîtrise de l'hygiène en amont sur l'animal excréteur.

REMERCIEMENTS

Cette synthèse a été possible grâce aux travaux du PEP caprin Rhône-Alpes, du Centre fromager de Carême Provence Alpes Côtes d'Azur.

De Crémoux R., Poutrel B., Pillet G., Perrin., Ducelliez M., Heuchel V. 1994. International Symposium « somatic cells and milk of small ruminants » Potenza (Italie) 25-27/09/94.

Jean M. 1989. Thèse de Doctorat. Université de Cean. Mai 1989.

Peretz. 1994. Ecopathologie Lyon. CR n°6

Vernozy-Rozand C. 1998. 9^{ème} rencontres GTV R-A, ENVL. 18 juin 1998.

Sèsquès M. 1994. Thèse de Doctorat. n° 15 594 Université Claude Bernard 1994.

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