

Incidence de la température sur l'évolution de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* dans les fromages fermiers au lait cru de chèvre et à pâte lactique

V. DAVID (1), B. GUERIN (2), B. FONTEZ (1), H. TORMO (2), Y. LEFRILEUX (3)

(1) Institut de l'Elevage, 149 rue de Bercy, 75595 Paris cedex 12

(2) Centre Fromager de Carmejane, 04510 Le Chaffaut, St Jurson

(3) Station expérimentale caprine du Pradel, 07170 Mirabel

avec la collaboration de Vincent Heuchel (1) et de Paul Le Mens (Institut de l'Elevage, Monboucher (26))

RESUME – Les travaux présentés dans cet article visaient à étudier l'incidence de la température sur l'évolution de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* dans les fromages fermiers au lait cru de chèvre et à pâte lactique. Ils se divisent en deux parties : des observations en conditions réelles réalisées sur des fromages exposés à la vente sur un marché et des fromages restés à la ferme dans leurs conditions habituelles, et un essai en laboratoire dans lequel les fromages étaient exposés à différentes températures (4 °C, 18 °C, 22 °C, 32 °C). Quelque soit la température d'exposition, les populations en *S. aureus* et *E. coli* ont tendance à décroître au cours du temps (entre 1 et 8 jours). Pour *S. aureus*, cette décroissance est d'autant plus importante que la température d'exposition est élevée. Ainsi, pour les germes *S. aureus* et *E. coli* et pour des fromages fermiers à pâte lactique au lait cru de chèvre, une température de conservation ou d'exposition de 18 °C ou plus n'augmenterait pas les risques sanitaires par rapport à une température de 4 °C.

Effects of temperature on growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in farm made cheeses (goat raw milk acid curd cheeses)

V. DAVID (1), B. GUERIN (2), B. FONTEZ (1), H. TORMO (2), Y. LEFRILEUX (3)

(1) Institut de l'Elevage, 149 rue de Bercy, 75595 Paris cedex 12

SUMMARY - The purpose is to study the effect of temperature on growth of *S. aureus* and *E. coli* in farm made cheese (goat raw milk acid curd cheeses). The work is divided in two parts. In the first part, some observations are made in real conditions (cheeses on open-air stalls and cheeses in cheese made units). In the second part, cheeses are exposed to different temperatures (4°C, 18°C, 22°C and 32°C) during 8 days. The experimented cheeses have natural contamination. Whatever temperature the cheese are exposed, *S. aureus* and *E. coli* populations tend to decrease from day 1 to day 8. The higher temperature the more *S. aureus* populations decrease. So, for *S. aureus* and *E. coli*, a low temperature doesn't seem to be a necessity to prevent sanitary risks.

INTRODUCTION

Depuis mi 1999, les représentants professionnels de la filière laitière fermière travaillent à la réalisation d'un guide des bonnes pratiques d'hygiène. La rédaction de ce document a fait ressortir le besoin d'acquiescer des références techniques permettant de préconiser des températures de transport et d'exposition à la vente compatibles avec la qualité organoleptique, la salubrité des fromages et la réalité fermière. En effet, les exigences réglementaires concernant les températures de transport et de présentation à la vente des fromages apparaissent aujourd'hui peu explicites. L'arrêté ministériel du 9 mai 1995 fixant les températures maximales à respecter lors de la vente directe des denrées alimentaires, ne cite pas explicitement les fromages égouttés ou affinés. L'arrêté du 20 juillet 1998 place la définition des températures de transport sous la responsabilité des producteurs. Face à cette situation, nombre de services vétérinaires départementaux ont des exigences jugées excessives par les producteurs et incompatibles avec la qualité organoleptique de leurs produits : températures d'exposition à la vente sur les marchés de 4-6 °C, achat de vitrines frigorifiques...

Il a donc été décidé d'entreprendre une étude visant à mieux connaître l'incidence de la température sur le développement de *Staphylococcus aureus* et d'*Escherichia coli* dans des fromages fermiers à pâte lactique au lait cru de chèvre, pendant le période où ils peuvent être mis sur le marché.

Ce travail a été conduit pendant l'été 2000 par le Centre Fromager de Carmejane, l'Institut de l'Élevage, le PEP Caprin Rhône-Alpes, la ferme expérimentale caprine du Pradel, le laboratoire d'analyse d'hygiène alimentaire du César (69) et le laboratoire départemental de Dranguignan (83).

1. MATERIEL ET METHODES

Ce travail s'est déroulé en deux parties.

1.1. UN « ESSAI MARCHÉ »

Les observations ont été conduites sur 64 séries de fromages de chèvre au lait cru et à coagulation lactique prélevées dans des exploitations fromagères fermières des régions Provence-Alpes-Côte-d'Azur et Rhône-Alpes. Le choix des exploitations a été effectué tout d'abord en fonction de contraintes organisationnelles liées aux analyses microbiologiques. Puis, seules les exploitations dont les derniers résultats d'analyses microbiologiques (résultats d'autocontrôles) avaient mis en évidence la présence de *Staphylococcus aureus* ou d'*Escherichia coli* ont été retenues. Les fromages prélevés étaient âgés de 3 à 8 jours.

Chaque série était constituée de 9 fromages issus de la même fabrication. 4 restaient à la ferme et 5 allaient au marché et étaient exposés à la vente, sans modification des pratiques habituelles des producteurs.

Une sonde de température (Thermo-traceurs® de Oceansoft) placée dans un des 3 fromages allant au marché enregistre, toutes les deux minutes, pendant tout le transport et l'exposition à la vente, la température. La température de la salle dans laquelle les fromages « ferme » étaient stockés était relevée.

Au retour du marché, les fromages « marché » et les fromages « ferme » étaient conservés dans les mêmes conditions puis, envoyés au laboratoire dans une boîte de polystyrène contenant des plaques eutectiques. Le lendemain, les analyses microbiologiques étaient réalisées sur un broyat de deux fromages « ferme » d'une part, et deux fromages « marché » d'autre part : dénombrement de *Staphylococcus aureus* (NF V 08-057-2) et d'*Escherichia coli* (NF V08-053), recherche de *Listeria monocytogenes* (NF V08-055). Les 4 fromages restant (2 fermes, 2 témoins) étaient stockés pendant 7 jours à 15 °C, puis faisaient l'objet des mêmes d'analyses microbiologiques.

1.2. UN ESSAI EN LABORATOIRE

Cet essai a été réalisé avec des fromages fermiers au lait cru de chèvre et à coagulation lactique. Ces fromages âgés

de 3 à 8 jours ont été prélevés dans 19 exploitations et ont été choisis car présentant une contamination naturelle en *S. aureus* supérieure à 100 UFC/g mise en évidence au cours des deux mois précédents.

Dans chaque exploitation, 16 fromages d'une même fabrication ont été prélevés et stockés par lot de 4 à 4 °C, à 18 °C, à 22 °C et à 32 °C pendant 8 jours.

Après une journée, des dénombrements de *Staphylococcus aureus* (AFNOR - V08-057.2) et d'*Escherichia coli* (AFNOR - V08-053) étaient réalisés sur un broyat de 2 fromages pour chaque exploitation et chaque classe de température. Sept jours plus tard, les mêmes analyses étaient réalisées sur un broyat des deux fromages restant.

1.3. LE TRAITEMENT DES DONNÉES

Sur les données de l'essai laboratoire, les effets de la température et de la durée de stockage sur l'évolution de la contamination ont été traités par un modèle d'analyse de variance en mesures répétées, prenant en compte la non indépendance entre les dénombrements mesurés sur les séries de fromages issus d'une même fabrication.

Les résultats des dénombrements ont fait l'objet d'une transformation logarithmique avant cette analyse et par convention pour le calcul des moyennes et écarts-type, on a affecté la valeur 5 à tous ceux inférieurs à 10 UFC/g (limite de détection des méthodes d'analyse).

La plupart des résultats de l'analyse statistique des données provenant de l'essai marché ne sont pas présentés ici.

Tous les traitements ont été réalisés à l'aide du logiciel S.A.S. (Statistical Analysis System - version 6.12).

2. RESULTATS

2.1. QUALITÉ BACTÉRIOLOGIQUE DES FROMAGES

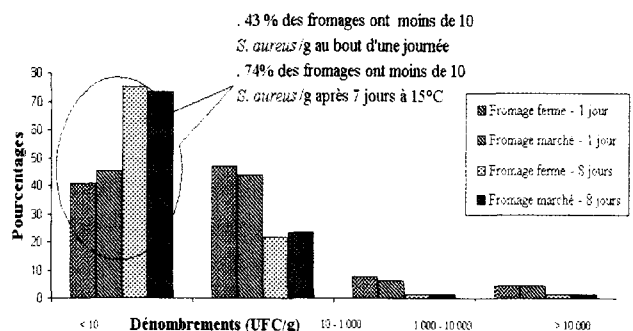
2.1.1 Résultats des dénombrements de *S. aureus* et *E. coli* à un jour

La proportion de fromages présentant un résultat de dénombrements en *S. aureus* ou *E. coli* inférieurs à 10 UFC/g (limite de détection des méthodes d'analyse) est élevée. Dans l'« essai marché », elle est égale à 43 % et 41 % respectivement pour *S. aureus* et *E. coli*.

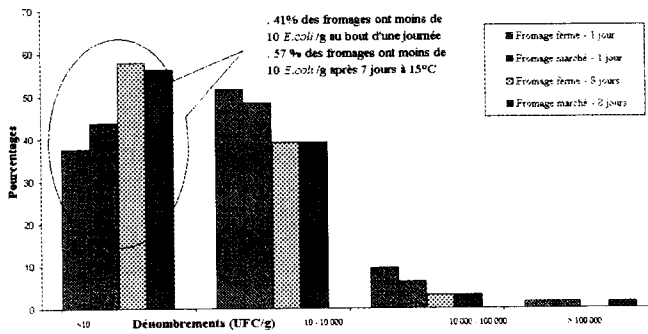
Dans l'« essai laboratoire », les pourcentages correspondant sont 42 % et 48 %.

Dans l'« essai marché », près de 45 % des fromages présentent un résultat de dénombrement de *S. aureus* compris entre 10 et 1 000 UFC/g, ce chiffre est de 51 % dans l'« essai laboratoire ». Pour *E. coli* et la classe de dénombrement 100 et 10 000 UFC/g les chiffres correspondant sont respectivement 50 % et 43 %.

Graphique 1
Répartition des dénombrements en *S. aureus* par type de fromages et durée d'exposition



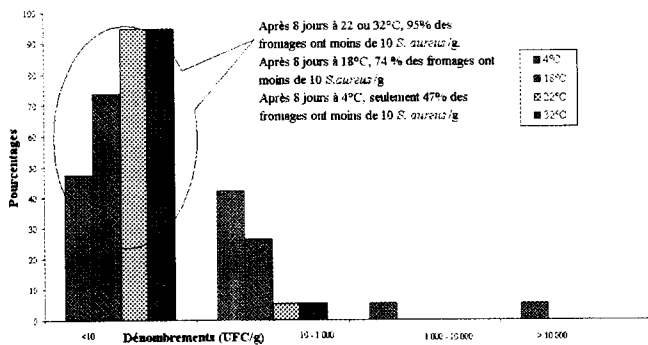
Graphique 2
Répartition des dénombrements en *E. coli*
par type de fromages et durée d'exposition



Peu de fromages ont des résultats supérieurs à 10 000 *S. aureus*/g et 100 000 *E. coli*/g.

2.1.2. Evolution des dénombrements au cours du temps
Dans l'« essai marché », comme on peut le visualiser dans les graphiques 1 et 2, la proportion de fromages dont les dénombrements en *S. aureus* ou *E. coli* sont inférieurs à 10 UFC/g augmente entre 1 et 8 jours alors que dans chacune des classes supérieures le pourcentage de fromages diminue. Des évolutions comparables ont été observées dans l'« essai laboratoire » : à 1 jour 42 % des fromages avaient moins de 10 *S. aureus*/g et à 8 jours 78 %. Pour *E. coli* les chiffres correspondant sont 49 % et 67 %.

Graphique 3
Répartition des dénombrements en *S. aureus*
par classe de température après 8 jours d'exposition



2.1.3. Résultats des dénombrements selon les différentes classes de température (essai laboratoire)

Après 1 jour de traitement 79 % des fromages incubés à 32 °C ont un résultat de dénombrement de *S. aureus* inférieur à 10 UFC/g contre respectivement 42 %, 26 % et 21 % à 22, 18 et 4 °C. A 8 jours, ces chiffres passent à 95 % pour les températures 32 et 22 °C, 74 % pour 18 °C et 47 % pour 4 °C (graphique 3).

Pour *E. coli*, après 8 jours de traitement 84 % des fromages incubés à 32 °C ont un résultat de dénombrement de *E. coli* inférieur à 10 UFC/g pour respectivement 74 %, 63 % et 47 % à 22, 18 et 4 °C (graphique 4).

Aucune *L. monocytogenes* n'a été détectée ni sur les fromages « ferme » ni sur les fromages « marché », que les analyses aient été faites au retour du marché ou après 7 jours à 15 °C.

2.2. EFFET DE LA TEMPÉRATURE ET DE LA DURÉE D'EXPOSITION

L'évolution de la contamination dans les fromages entre 1 et 8 jours est appréciée pour chaque fromage, par la différence des dénombrements à 1 jour (D_{J1}) et à 8 jours (D_{J8}). Les résultats d'analyse de variance de l'effet global de la température sur cette évolution, pour les deux essais (« marché » et « laboratoire ») et pour les deux bactéries étudiées sont présentés de manière synthétique dans le tableau 1.

montrent que d'une part, les dénombrements décroissent en moyenne entre 1 et 8 jours, et que d'autre part la température intervient significativement sur l'importance de cette décroissance, sauf dans le cas de l'essai laboratoire concernant *E. coli*.

Graphique 4
Répartition des dénombrements en *E. coli*
par classe de température après 8 jours d'exposition.

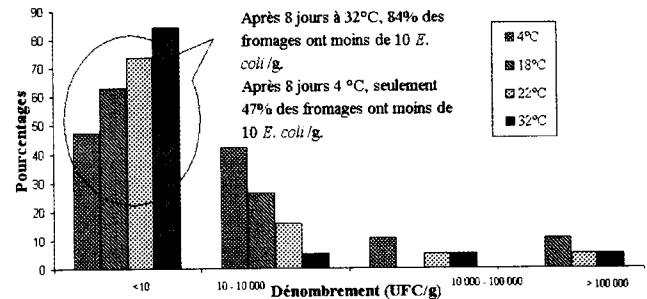


Tableau 1
Incidence de la température sur l'évolution des populations de *S. aureus* et d'*E. coli* entre 1 et 8 jours.

		Evolution moyenne ⁽¹⁾ (log (UFC/g))	Incidence de la température ⁽²⁾ Test de Student
Essai marché			
<i>S. aureus</i>	$D_{J1} - D_{J8}$	0,63 (1,07)	**
<i>E. coli</i>	$D_{J1} - D_{J8}$	0,28 (1,19)	*
Essai laboratoire			
<i>S. aureus</i>	$D_{J1} - D_{J8}$	0,53 (0,80)	**
<i>E. coli</i>	$D_{J1} - D_{J8}$	0,12 (1,56)	n.s.

Pour des soucis de simplicité, les résultats des essais marché ne sont présentés dans la suite de l'article mais les observations et les résultats des traitements réalisés vont dans le même sens que pour *S. aureus* dans les essais laboratoires.

Dans l'« essai laboratoire », les évolutions moyennes de la population de *S. aureus* entre 1 et 8 jours en fonction de chaque température étudiée sont présentées dans le tableau 2. On observe des décroissances significatives à 4, 18 et 22 °C. En revanche à 32 °C la population de *S. aureus* reste stable en moyenne, entre 1 et 8 jours.

Tableau 2
Evolution des populations de *S. aureus* et d'*E. coli* entre 1 et 8 jours ($D_{J1} - D_{J8}$) pour chaque température.

Température	Moy. des écarts ⁽¹⁾ en log UFC/g	Test de Student ⁽²⁾
4°C	- 0,56 (0,18)	**
18°C	- 0,66 (0,17)	**
22°C	- 0,86 (0,22)	**
32°C	- 0,05 (0,09)	n.s.

(1) entre parenthèse : écart-type ;

(2) n.s. : non significatif au seuil de 5 % ;

** : écart hautement significatif ($p < 1\%$) ;

Enfin, le tableau 3 présente les comparaisons entre les moyennes des dénombrements de *S. aureus* correspondant à chaque modalité de température, à 1 jour d'une part et à 8 jours d'autre part.

On observe qu'après 1 jour, les dénombrements moyens obtenus à 32 °C sont significativement moins élevés que ceux obtenus à 4, 18, 22 °C et que les dénombrements moyens

obtenus à 18 °C sont significativement moins élevés que ceux obtenus à 4 °C. Pour les dénombrements obtenus après 8 jours, on observe que ceux obtenus à 22 et 32 °C sont significativement moins élevés que ceux obtenus à 4 °C. On constate aussi la présence d'écarts significatifs de dénombrement sur la majorité des comparaisons entre modalités de température après 1 jour. En revanche, à 8 jours, les effets de la température apparaissent beaucoup moins marqués et ne restent significatifs qu'entre les modalités extrêmes (DT4 contre DT22 et DT32).

Tableau 3
Essai laboratoire - Ecart entre les moyennes des dénombrements de *S. aureus* aux différentes températures

Modalités de température comparées ⁽¹⁾	Après 1 jour (2) (log (UFC/g)).	Test de Tukey-Kramer (3)	Après 8 jours (2)	Test de Tukey-Kramer (3)
D _{T4} -D _{T18}	0,43 (0,14)	*	0,53 (0,20)	n.s.
D _{T4} -D _{T22}	0,47 (0,19)	n.s.	0,76 (0,22)	*
D _{T4} -D _{T32}	1,22 (0,21)	**	0,71 (0,23)	*
D _{T18} -D _{T22}	0,04 (0,13)	n.s.	0,23 (0,10)	n.s.
D _{T18} -D _{T32}	0,79 (0,20)	**	0,18 (0,09)	n.s.
D _{T22} -D _{T32}	0,75 (0,24)	*	- 0,05 (0,07)	n.s.

(1) DT_i-DT_j = écart entre les moyennes des dénombrements obtenus à i°C et j°C ;

(2) Entre parenthèses : Ecart-type

(3) n.s. : non significatif au seuil de 5 % ; ** : écart hautement significatif (p < 1 %) ; * : écart significatif (1 % < p < 5 %).

3. DISCUSSION - CONCLUSION

Malgré une sélection préalable des exploitations sur la présence d'une contamination en *S. aureus*, on peut noter une qualité bactériologique des fromages généralement satisfaisante au moment de la mise en marché. Plus de 40 % de fromages présentent des résultats de dénombrements inférieurs à 10 UFC/g. Un chiffre comparable pour *E. coli* montrent aussi la bonne qualité des fromages fermiers au lait cru de chèvre et à pâte lactique pour ce germe.

Les observations et traitements mettent en évidence une décroissance significative des populations de *S. aureus* et d'*E. coli* au cours du temps. Dans l'essai laboratoire, l'absence de différences significatives entre les populations de *S. aureus* dénombrées après 1 jour et 8 jours à 32 °C est certainement le fait de la grande proportion de résultats inférieurs à 10 UFC/g dès 1 jour de traitement. La décroissance des populations en *S. aureus* et *L. mono* au cours de l'affinage et du stockage de fromages à pâtes lactiques au lait cru de chèvre avait été observée dans les travaux de Morgan et al (2000). Cette décroissance pourrait s'expliquer par des phénomènes

de compétition avec la flore lactique et d'affinage ou du fait des caractéristiques biochimiques des fromages à pâtes lactiques (pH bas, taux de sel élevé).

Les travaux exposés dans cet article semblent montrer que plus la température est élevée plus la décroissance de la population de *S. aureus* au cours du temps est importante. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une augmentation de la compétition entre la flore lactique ou d'affinage et la flore indésirable. L'activité plus intense des flores technologiques dans des fromages exposés à de plus hautes températures se traduirait par une augmentation de la teneur en acide gras qui affecterait la survie des micro organismes. Ces hypothèses ont été avancées par certains auteurs qui ont, eux aussi, observé lors de l'affinage ou le stockage de fromages à pâte pressée cuite une diminution plus importante des populations indésirables quand la température est la plus élevée. On peut citer, par exemple, les observations faites par P. Gaya et al (1988) et Nunez et al (1985) sur des *S. aureus* et des entérobactéries dans du Manchego et celles de Goepfert et al (1968) et White et al (1976) sur des *Salmonella* dans du Cheddar. En ce qui concerne les fromages à coagulation présure à pâte non pressée et non cuite, on peut citer les travaux de Nunez et al (1986) sur des *S. aureus* dans du Burgos. En conclusion, pour les germes *S. aureus* et *E. coli*, une température basse ne semble pas déterminante pour la maîtrise de la qualité sanitaire des fromages fermiers à coagulation lactique lors de leur conservation, de leur transport ou de leur exposition à la vente.

Remerciements : PEP Caprin Rhône-Alpes et les OPA associées, FRECAP, ONILAIT, conseils régionaux de PACA et Rhône-Alpes, laboratoire d'analyse d'hygiène alimentaire du César (69), laboratoire départemental d'analyse de Draguignan.

Gaya, P. and al. 1988. Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in manchego cheese. International Journal of Food Microbiology. 6, 249-257.

Goepfert, J.M. and al. 1968. Behaviour of *Salmonella typhimurium* during manufacture and curing of Cheddar cheese. Appl. Microbiol. 16, 862-866.

Morgan and al. 2000. Comportement de *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes* dans les fromages de chèvre au lait cru Renc. Rech. Ruminants, 7, 351-354

Nunez, M. and al. 1985. Influence of manufacturing and ripening conditions on survival of *Enterobacteriaceae* in Manchego cheese. J. dairy Sci. 68, 794-800.

Nunez, M. and al. 1986. The effect of lactic starter inoculation and storage temperature on the behaviour of *Staphylococcus aureus* and *Enterobacter cloacae* in Burgos cheese. J. dairy Sci. 68, 794-800.

White. C.H., and al. 1976. Survival of *Salmonella* in Cheddar cheese. J. Milk Food Technol. 39, 328-331.