

Recherche d'écosystèmes microbiens inhibiteurs de la croissance de *S. aureus* dans le lait de chèvre

K. RAYNAL-LJUTOVAC (1), J. BARRAL (2), B. POUTREL (3), I. GUILLET (1), J. BOIVIN (2), P. GABORIT (1), R. DIRBERG (4), R. DE CREMOUX (5)

(1) Institut Technique des Produits Laitiers Caprins, Avenue François Mitterrand, BP 49 - 17700 SURGERES

(2) Centre Fromager de Carmejane - 04510 LE CHAFFAUT, SAINT-JURSON

(3) INRA, Unité de pathologie infectieuse et immunologie, Equipe de recherche sur les mammites - 37380 NOUZILLY

(4) Institut de l'Elevage, 149 Rue de Bercy - 75595 PARIS Cedex 12

(5) Institut de l'Elevage, Chambre d'Agriculture du Tarn, BP 89 - 81003 ALBI Cedex

RESUME - Les outils et méthodes actuellement disponibles ne permettent pas une maîtrise totale du risque de contamination des produits au lait cru par *Staphylococcus aureus*. Or ce microorganisme est responsable de défauts de conformité des fromages et représente un enjeu économique et sanitaire pour l'ensemble de la filière caprine au lait cru. Cette étude a donc eu pour objectif de rechercher des écosystèmes microbiens natifs du lait, naturellement inhibiteurs de la croissance de *S. aureus*. Dans un premier temps, l'étude de l'historique des contaminations de laits de troupeaux de chèvres collectés par les entreprises a permis de choisir des exploitations. Les critères de sélection étaient les suivants : moins de 3 dépassements de 200 UFC/ml et aucun dépassement de 500 UFC/ml sur l'ensemble de la période 2002-2003. Au total, 55 laits des régions Poitou Charentes, Centre et PACA ont été sélectionnés pour être testés en lactofermentation avec une inoculation à 10^2 UFC/ml par une souche de *S. aureus* isolée de mammite caprine et rendue antibiorésistante afin de suivre son évolution spécifique. La croissance des souches natives était également suivie sur ces mêmes laits non inoculés. A l'issue de ces tests, certains laits se sont avérés inhibiteurs des souches natives ou inoculée voire des deux (croissance relative sur 24 h inférieure à 2 log voire absence de croissance de *S. aureus*). Aucune relation n'a été montrée entre le potentiel inhibiteur et l'aptitude acidifiante des laits. Ce potentiel inhibiteur est apparu généralement peu stable dans le temps, évoluant vraisemblablement en fonction des variations de l'écosystème microbien du lait en relation avec le renouvellement du troupeau, le changement d'alimentation, le climat...

Search for microbiological ecosystems inhibiting *S. aureus* growth in goat milk

K. RAYNAL-LJUTOVAC, J. BARRAL, B. POUTREL, I. GUILLET, J. BOIVIN, P. GABORIT, R. DIRBERG, R. DE CREMOUX
Institut Technique des Produits Laitiers Caprins, Avenue François Mitterrand, BP 49, 17700 SURGERES

SUMMARY - The tools and methods available at the moment do not ensure a complete safety of products made with raw milk concerning contamination by *Staphylococcus aureus*. This microorganism is responsible for the non conformity of cheeses and is of great economical and sanitary importance for all caprine fields. Therefore, this study focussed on searching for microbiological ecosystems from milk naturally inhibiting *S. aureus* growth. A first step consisting in studying the history of contamination of goat herd milks collected by dairies permitted to choose herds according to the following criteria : less than 3 values above 200 UFC/mL and none above 500 UFC/mL for the whole period 2002-2003. Fifty-five goat herd milks from the Poitou Charentes, Centre and PACA regions were selected to be submitted to lactofermentation tests by inoculating 10^2 CFU/mL *S. aureus* strain from caprine mastitis, which was made antibioresistant in order to specifically follow its growth. The development of native strains was also studied in the same milks without inoculation. These tests evidenced concurrency of goat milks inhibiting growth of native, inoculated or both types of *S. aureus* strains (less than 2 log growth and even the absence of development of *S. aureus*). No relationship was found between the inhibitory potential and acidification properties of the milks. Moreover, it seems that this inhibitory property is generally not stable and may vary according to the changes in the microbiological ecosystem related to herd renewal, feeding changes, climate...

INTRODUCTION

En France, *Staphylococcus aureus* est la seconde cause de toxi-infections alimentaires collectives déclarées (TIAC). Le lait et les produits laitiers sont plus particulièrement incriminés dans la survenue de ces intoxications. Ainsi, la limitation de la contamination des produits laitiers par *S. aureus* constitue un enjeu économique et sanitaire pour l'ensemble des filières au lait cru, notamment caprine.

Malgré les travaux réalisés dans ce domaine depuis de nombreuses années, les outils mis à la disposition des producteurs ne permettent pas d'assurer une totale maîtrise des risques de contamination des laits et des fromages.

Or, d'après des études antérieures réalisées sur des fromages au lait de vache (Millet *et al.*, 2006), il semble que des écosystèmes de laits puissent limiter naturellement la croissance de germes pathogènes (laits dits "inhibiteurs").

Dans cette hypothèse, le présent programme de recherche vise à évaluer dans quelle mesure il est possible de tirer parti de la diversité microbienne des laits pour garantir la qualité sanitaire des produits vis-à-vis de *S. aureus*. Ces travaux s'insèrent dans un programme plus global concernant la maîtrise de la contamination par ce pathogène en filière caprine et coordonné par l'Institut de l'Élevage.

1. MATERIEL ET METHODES

1.1. SÉLECTION DES ÉLEVAGES

La recherche de laits de troupeaux susceptibles de présenter un potentiel inhibiteur vis-à-vis de *S. aureus* a reposé sur l'exploitation préalable des données fournies par les entreprises laitières et le Laboratoire Interprofessionnel Laitier du Centre Ouest à Surgères. Elle était fondée sur l'hypothèse selon laquelle les laits régulièrement peu contaminés en *S. aureus* pouvaient être considérés soit comme potentiellement inhibiteurs soit issus de troupeaux dépourvus de chèvre fortement excrétrice. Les exploitations sélectionnées présentaient moins de 3 dépassements de 200 UFC/ml et aucun dépassement de 500 UFC/ml sur l'ensemble de la période 2002-2003.

1.2. LACTOFERMENTATIONS

Les laits retenus ont été testés en lactofermentation. Deux types de suivis ont été réalisés en parallèle, l'un après inoculation d'une souche de *S. aureus* et l'autre en l'absence d'inoculation (Figure 1). Les courbes d'acidification des laits ont également été enregistrées pendant les lactofermentations.

1.2.1. Mise en œuvre des laits de troupeaux

Des laits d'une, ou deux traites maximum, ont été collectés dans des conditions les plus aseptiques possibles (matériel stérilisé) puis transportés au froid (glacière + plaques eutectiques) jusqu'aux laboratoires (ITPLC ou Centre Fromager de Carmejeane). Les échantillons (2 litres par échantillon) étaient maintenus à 4°C avant d'être mis en lactofermentation le jour même.

La température de lactofermentation a été fixée à 27°C. Le choix d'une température de 27°C constitue un compromis entre température de début et de fin de fabrication en technologie présure, technologie considérée comme sensible vis-à-vis de la croissance de *S. aureus* : emprésurage à 30 voire 34°C mais des températures comprises entre 20 (produit de type Chèvre Boîte) et 25-28°C (caillé doux de type Banon) après 24 heures d'égouttage. En outre, à 30°C, la flore lactique acidifiante est favorisée au détriment des

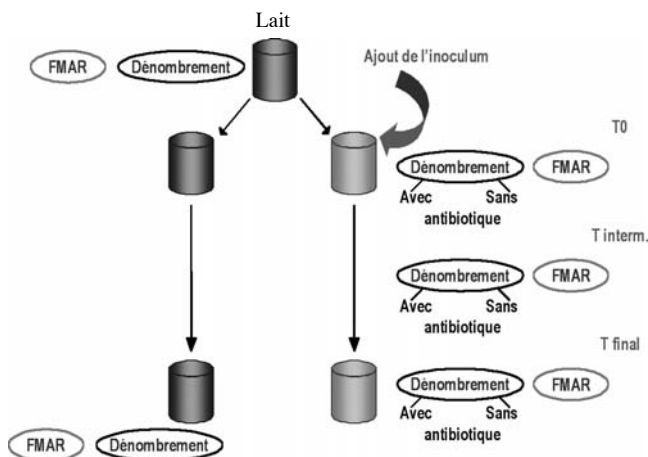
flores aromatiques qui croissent à des températures plus basses que les acidifiantes. Or, les flores aromatiques (bactéries hétérofermentaires), peuvent également synthétiser des substances (acides organiques, bactériocines...) susceptibles de participer à l'inhibition de la croissance de *S. aureus*.

La taille de l'inoculum a été fixée à 100 UFC/ml, contamination proche des conditions effectives de terrain, contrairement aux essais antérieurs réalisés avec des niveaux beaucoup plus élevés (Vernozy-Rozand *et al.*, 1998). Le test revient à étudier le comportement d'un écosystème face à l'apparition de nouvelles infections (généralement en nombre limité) et d'un apport transitoire de *S. aureus* dans le lait de tank suite à l'excrétion mammaire des bactéries par les chèvres infectées. On peut en effet considérer qu'un animal, infecté unilatéralement, présent dans un troupeau de 100 chèvres, contribue au niveau de contamination du tank dans des limites comprises entre 25 et 50 UFC/ml (hypothèse d'un niveau d'excrétion équivalant à 5 000 à 10 000 UFC/ml). L'inoculum est préparé selon Gomez-Lucia *et al.* (1992) avec une étape de centrifugation (3800 g/20 min à 4°C) et un lavage afin de retirer toute trace d'entérotoxine éventuellement produite lors de la culture (37°C/24h en bouillon BHI +1% de lait).

La souche inoculée (souche exogène) devait pouvoir être distinguée des *S. aureus* présents naturellement dans les laits. Ainsi, l'INRA de Nouzilly a mis au point une souche de *S. aureus* ayant un marqueur de résistance à un antibiotique, la rifamycine. La souche retenue est d'origine caprine (lait de mammite) et présente un potentiel entérotoxigène de type C.

Pour chaque lait testé, un témoin non inoculé était également suivi afin d'observer la croissance des souches natives de *S. aureus* en l'absence d'ajout de souche exogène.

Figure 1 : schéma expérimental de sélection de laits inhibiteurs de la croissance de *S. aureus*



Pour chaque série de laits, un lait stérile de référence (LA ITG) a également été inoculé de façon à contrôler la répétabilité de la croissance de la souche exogène et à évaluer la croissance de *S. aureus* en l'absence d'acidification et de flore endogène.

1.2.2. Analyses microbiologiques et biochimiques

Des dénombrements de *S. aureus* ont été réalisés sur les laits (et gels) au temps initial (T0), temps intermédiaire et temps final (T final).

Le prélèvement réalisé au temps intermédiaire a été fixé à un delta pH de 0,08 unité pH par rapport au pH initial, ce qui correspond à la phase de latence des bactéries lactiques acidifiantes. Ceci permet d'apprécier la croissance relative des souches de *S. aureus* en absence d'acidification des laits, ce qui pourrait laisser présager d'un caractère inhibiteur des composés du lait et/ou de la flore autre qu'acidifiante.

Le temps final été fixé à pH 5 ou par défaut à 24h. En effet, *S. aureus* étant acidosensible, le maintien des laits à des pH inférieurs à 5 dans le cas de laits s'acidifiant fortement en 24h pourrait biaiser l'interprétation quant à leur effet inhibiteur. Par ailleurs, pour des laits à faible cinétique d'acidification (pH supérieur à 5 à 24h), la lactofermentation était arrêtée à 24 h.

Le dénombrement des souches de *S. aureus* dans leur ensemble (souches natives du lait et souche exogène) a été réalisée sur un milieu Baird Parker + RPF après incubation à 37°C pendant 24h (kit Biomérieux selon la norme NF 08 057-2). Les souches exogènes ont été dénombrées spécifiquement après adjonction de rifamycine (128µg/ml) dans le milieu de culture.

Ce dispositif a permis de mesurer les croissances relatives des souches natives et de la souche marquée dans les laits testés, d'évaluer le comportement des laits en dehors de tout apport de souche exogène, de mettre en évidence, le cas échéant, une compétition entre les souches de *S. aureus* en présence.

Les dénombrements de flore mésophile aérobie revivifiable (flore totale) étaient réalisés sur milieu PCA, 72h à 30°C (IDF-FIL 100B :1991).

Les analyses de la matière grasse, matière protéique, cellules, IgG et inhibiteurs totaux (résidus d'antibiotiques, produits de nettoyage...) ont également été réalisées.

2. RESULTATS

Au total, 55 laits des régions Poitou Charentes, Centre et PACA ont été testés en 2004 et 17 laits provenant des exploitations dont les laits s'étaient avérés les plus prometteurs en 2004 ont été évalués à nouveau en 2005.

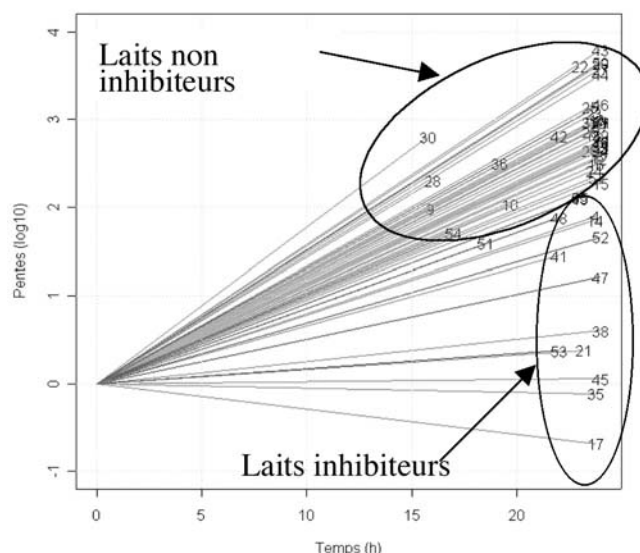
2.1 CARACTERE INHIBITEUR DES LAITS

Les laits dits "inhibiteurs" ont été définis comme étant des laits pour lesquels la croissance des *S. aureus* a été limitée. Ce potentiel inhibiteur a pu s'exprimer vis-à-vis des souches natives de *S. aureus*, de la souche exogène ou de l'ensemble d'entre elles. En outre, il a pu être mis en évidence à temps intermédiaire ou seulement à temps final.

La figure 2 illustre ainsi la croissance relative de la souche exogène pour les 55 laits de troupeaux testés en 2004.

Certains laits ont présenté une croissance nulle de *S. aureus* et ont été considérés comme fortement inhibiteurs (exemple des laits 17, 35 et 45) ; d'autres ont limité la croissance à 2 log maximum (exemple des laits 21, 38, 52 et 53) comparés à des laits jugés non inhibiteurs présentant une augmentation de la population en *S. aureus* de plus de 2 log (exemple des laits 22, 30, 42, 44...).

Figure 2 : exemple de croissance relative de la souche de *S. aureus* exogène entre To et T final (différence de log UFC/ml) pour les 55 laits de troupeaux testés en 2004.



2.2 POTENTIEL ACIDIFIANT DES LAITS

L'étude parallèle de l'évolution du pH (figures 3 et 4) montre que l'expression du potentiel inhibiteur d'un lait n'est pas associée à un profil d'acidification type.

Figure 3 : exemple de profils d'acidification de laits jugés inhibiteurs en 2004 entre To et T final.

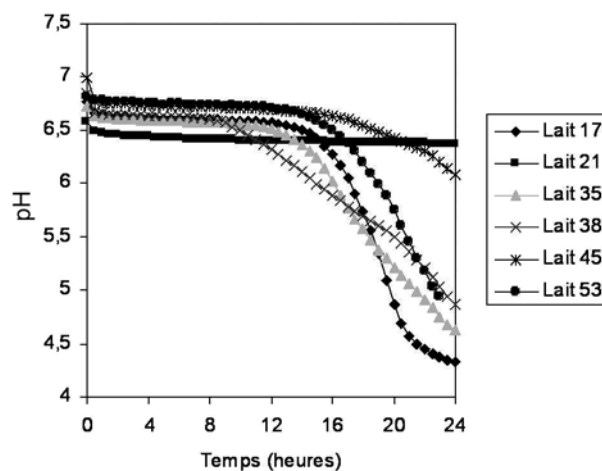
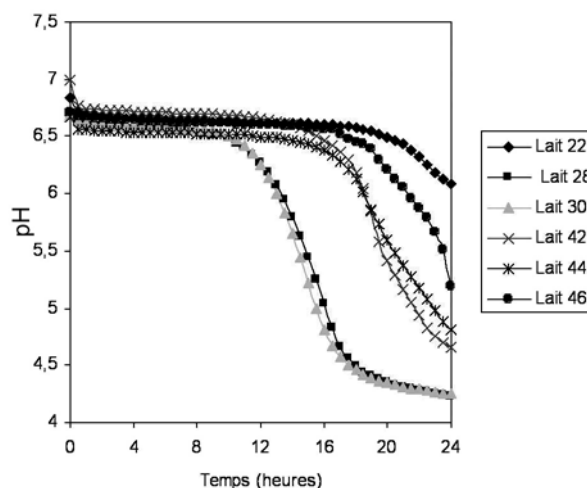


Figure 4 : exemples de profils d'acidification de laits jugés non inhibiteurs en 2004 entre To et T final.



Par ailleurs, aucune relation n'a été mise en évidence entre le potentiel inhibiteur et les autres paramètres mesurés (composition biochimique et flore totale).

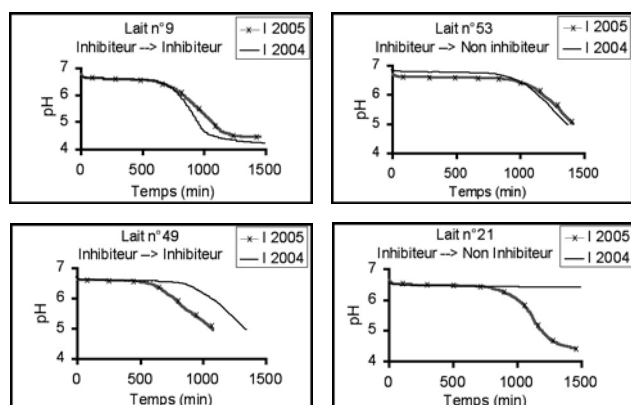
2.3. CARACTERE EVOLUTIF DU POTENTIEL INHIBITEUR DES LAITS

Les lactofermentations réalisées en 2004 ont permis de sélectionner une dizaine d'exploitations dans lesquelles les laits de tank avaient été jugés inhibiteurs. De nouveaux prélèvements ont été réalisés dans ces exploitations au cours de la campagne suivante de façon à renouveler les tests sur les laits selon le même protocole. Des exploitations caractérisées par des laits non inhibiteurs en 2004 ont également été retenues afin de servir de témoins.

En 2005, seuls 5 laits sont restés inhibiteurs de la souche exogène, des souches natives voire des deux types de souches. A l'inverse, 2 laits non inhibiteurs sont devenus inhibiteurs. Le potentiel inhibiteur, pour une exploitation donnée, évolue par conséquent au cours du temps, vraisemblablement suite aux variations de l'écosystème microbien (la présence d'inhibiteurs naturels sera testée ultérieurement) en relation avec le renouvellement du troupeau, le changement d'alimentation, le climat...

Les évolutions des courbes d'acidification ne sont pas corrélées avec les modifications du potentiel inhibiteur.

Figure 5 : exemple d'évolution des comportements des laits inhibiteurs en 2004.



La figure 5 montre des exemples types de comportements des laits testés : des propriétés inchangées pour le lait 9 tant du point de vue de l'acidification que de l'expression du potentiel inhibiteur ; cinétique d'acidification inchangée pour le lait 53 devenu néanmoins non inhibiteur en 2005 ; potentiel inhibiteur inchangé pour le lait 49 mais cinétique d'acidification modifiée ; modification conjointe des deux critères pour le lait 21.

Par ailleurs, les laits non inhibiteurs sont ceux qui présentent le plus souvent de fortes contaminations initiales, contrairement aux laits jugés inhibiteurs. Ceci semble être en accord avec notre hypothèse de départ.

CONCLUSION

L'approche expérimentale adoptée pour cette étude a permis de repérer des laits de chèvre inhibiteurs de la croissance de *Staphylococcus aureus*. Il apparaît également que le potentiel inhibiteur des laits est d'expression variable d'une exploitation à l'autre, sur le plan quantitatif (amplitude de "l'inhibition") et qualitatif (nature des souches inhibées, précocité de l'inhibition). Par ailleurs, ce potentiel est susceptible d'évoluer d'une campagne laitière à une autre, voire au sein d'une même lactation, indépendamment des variations de capacité acidifiante. C'est pourquoi, il sera intéressant d'apprécier ultérieurement la nature de ces inhibitions (flore microbiennes, inhibiteurs naturels...). L'étude se poursuit par des validations en fabrications fromagères de type lactique et présure. Différents niveaux d'inoculation sont testés. Les variations de potentiel inhibiteur des laits selon la souche inoculée sont étudiées : une autre souche produisant une entérotoxine de type A a été employée à cet effet.

Ce travail est réalisé dans le cadre d'un projet ACTA/ACTIA. Il bénéficie de plus d'un financement de l'Office de l'Élevage. Les auteurs tiennent à remercier Eurial Poitouaine, Sèvres et Belle et la Coopérative de Banon, le LILCO ainsi que les éleveurs ayant participé à l'étude.

Millet L. et al., 2006. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses, *Int J Food Microbiol*, 108(1), 105-114

Vernozy-Rozand C. et al., 1998. Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goat's milk lactic cheeses, *J Dairy Sci.*, 65, 2, 273-281.

Gomez-Lucia E. et al., 1992. Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J. Dairy Sci.*, 75, 19-26

International Dairy Federation 1991. Milk and milk products: enumeration of micro-organisms. *IDF standard 100B*. International Dairy Federation, Brussels

Norme NF V 08 057-2 1994. Méthode de routine pour le dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C – Partie 2 – Technique sans confirmation