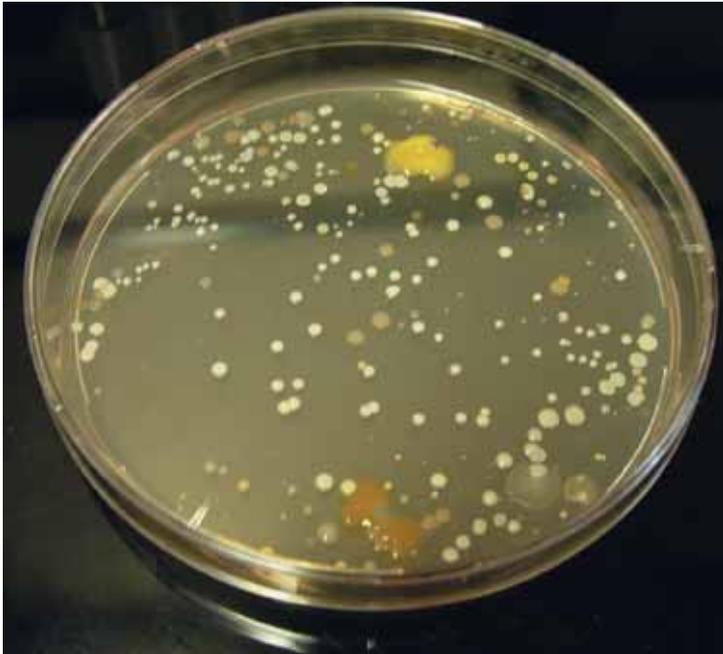


# CRITÈRES MICROBIOLOGIQUES POUR LA FABRICATION DU FROMAGE

Groupes de discussion



Schweizerische Eidgenossenschaft  
Confédération suisse  
Confederazione Svizzera  
Confederaziun svizra

Département fédéral  
de l'économie DFE  
**Station de recherche**  
**Agroscope Liebefeld-Posieux ALP**



## Contenu

1 Introduction	4
2 La flore du lait cru	5
3 Méthodes indirectes pour la détermination de la qualité microbiologique du lait	6
3.1 Réductase	6
3.2 Degré d'acidité du lait (11 h à 38°C)	7
3.3 Epreuve du lactofermentateur	8
3.4 Charge en germes du lait commercialisé	9
4 Paramètres microbiologiques classiques	10
4.1 Germes aérobies mésophiles (GAM)	10
4.2 Germes étrangers aérobies mésophiles	11
4.3 Germes halotolérants	12
4.4 Germes psychrotrophes	13
4.5 Germes lipolytiques (lipolytes)	14
4.6 Germes protéolytiques	14
5 Détermination sélective de types de germes définis	15
5.1 Sporulées aérobies (Bacillus)	15
5.2 Sporulées anaérobies / bacilles butyriques (méthode MPN ALP)	16
5.3 Clostridium tyrobutyricum (méthode par filtration)	18
5.4 Bactéries propioniques	19
5.5 Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs	20
5.6 Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires	21
5.7 Entérobactéries	22
5.8 Indicateurs fécaux	23
5.9 Staphylocoques à coagulase positive	26
6 Défauts du fromage provoqués par des germes nuisibles	27
7 Valeurs de référence pour les matières premières et les produits semi-finis	28
7.1 Lait du producteur	28
7.2 Lait de chaudière	28
7.3 Gruyère (après chauffage)	29
8 Valeurs de tolérance pour l'eau potable (non traitée, dans le réseau de distribution)	28
9 Analyses recommandées selon l'OHyg (état 1.04.2008) et AQ Fromarte 2008	29

## Abréviations

BPF	Bonnes pratiques de fabrication
LHF	Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs
LHO	Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires
MPN (NPP)	Most Probable Number (Nombre le plus probable)
MSDA	Manuel suisse des denrées alimentaires
OHyg	Ordonnance sur l'hygiène
OHyPL	Ordonnance réglant l'hygiène dans la production laitière
OPA	Ortho-phthaldialdéhyde = mesure pour les acides aminés libres
sp.	Espèce
ssp.	Sous-espèce
tefd	Teneur en eau du fromage dégraissé
UFC	Unités formant des colonies
VL	Valeur limite
VT	Valeur de tolérance

## 1 Introduction

Ce sont presque toujours des microorganismes qui sont la cause de l'altération du lait et des produits laitiers. Même dans les produits UHT exempts de germes, ce sont souvent les substances créées par des bactéries de la flore du lait cru qui limitent sa durée de conservation. Des microorganismes sont également la principale cause des défauts du fromage. Le fromager sait que seul un lait frais de qualité irréprochable et une gestion sûre du processus microbiologique permettent de fabriquer du fromage de qualité, qui se conserve bien. Naturellement, dans la pratique, l'épreuve de la réductase, de l'acidité et du lactofermentateur ainsi que le contrôle du pH pendant la fabrication sont les outils de gestion les plus importants. Cependant, dans de nombreux cas, des analyses microbiologiques portant sur des germes ou des groupes de germes bien déterminés sont nécessaires. Exemples:

- Analyse du lait cru par rapport aux germes responsables d'une mauvaise fermentation
- Analyse du lait cru par rapport à des germes pathogènes
- Analyse de l'eau potable
- Contrôles du produit fini
- Recherche de germes pathogènes dans les lieux de transformation et les équipements (par ex : Surveillance de *Listeria monocytogenes* selon l'OHyg art. 58d)

Le présent document est destiné aux groupes de discussion. Les critères microbiologiques les plus importants lors de la transformation du lait, leur signification au niveau pratique et, dans la mesure du possible, des valeurs de référence et de tolérance pour le lait cru, l'eau potable et les produits y sont traités. En ce qui concerne les germes pathogènes, seuls les staphylocoques seront abordés.

## 2 La flore du lait cru

Le lait issu d'une mamelle saine forme une sécrétion en grande partie stérile. La souillure bactérienne débute lors du passage dans le canal du trayon. Toutefois, les sources de contamination les plus importantes se situent à l'extérieur du pis. Exemples: peau de la mamelle et du trayon, ustensiles de traite, conduites, tanks pour le stockage et le transport, air ambiant, saleté aspirée par les gobelets trayeurs, etc. Les facteurs temps et température jouent également un rôle important, c'est-à-dire la multiplication des germes entre la traite et la transformation du lait.

Par rapport à l'aptitude à la transformation du lait, il n'y a pas que la charge en germes globale qui est déterminante mais aussi la composition de la flore. On sait qu'un nombre peu élevé de spores butyriques dans un lait autrement absolument irréprochable suffit pour détruire des lots entiers de fromages. Des analyses concernant des germes ou des groupes de germes spécifiques se justifient cependant seulement pour des germes problématiques. La composition de la flore du lait fournit aussi des informations précieuses au sujet de l'origine des germes et ainsi concernant de possibles sources de contamination (voir tabl. 1).

En général, la flore microbienne du lait cru frais est constituée avant tout de germes gram-positifs. Cependant, pendant le stockage au froid du lait, ce sont surtout les germes gram-négatifs qui se multiplient, de telle manière qu'après 1-2 jours de stockage on trouve une flore dominante de germes gram-négatifs.

Le choix des paramètres d'essai et des méthodes est basé sur l'objectif des analyses, sur le genre d'échantillon et souvent également sur les coûts. La recherche et le dénombrement de germes s'effectuent souvent uniquement dans des laboratoires spécialement équipés, mais fournissent en général des informations plus précises.

**Tableau 1:** Germes typiques de la flore du lait cru

	Source de contamination	Psychrotrophes
<b>Germes gram positifs</b>		
- Germes sporulés aérobies	Terre, poussière, foin (très répandu)	Partiellement
- Germes sporulés anaérobies (Clostridies)	Ensilage, fourrage vert en fermentation, bourbe	Non
- Entérocoques	Fèces, résidus de lait	Non
- Staphylocoques	Peau, muqueuses	Non
- Microcoques	Peau, résidus de lait	Partiellement
- Bactéries propioniques	Peau, résidus de lait, fourrage vert en fermentation, ensilage	Non
- Bactéries lactiques	Plantes, ensilages, résidus de lait, muqueuses	Non
- Bactéries corynéformes	Peau, sol	Partiellement
<b>Germes gram négatifs</b>		
- Colibactéries (E. coli)	Fèces, eaux usées	Non
- Entérobactéries	Plantes, fèces, eaux usées	Partiellement
- Pseudomonas	Eau, sol (très répandu)	Oui
- Alcaligènes, Flavobacterium, etc.	Eau, sol (très répandu)	Oui
<b>Levures</b>	Sol, plantes, résidus de lait (très répandues)	Oui

### 3 Méthodes indirectes pour la détermination de la qualité microbiologique du lait

#### 3.1 Réductase

Le test de la réductase (bleu de méthylène), très utilisé dans l'industrie laitière, représente une méthode indirecte simple pour surveiller la charge microbienne du lait cru. La „réductase“ figure parfois dans des contrats d'achat de lait en tant que critère de qualité.

<b>Méthode / définition :</b>	Temps de réduction (durée de décoloration) du lait à 38 °C après ajout de bleu de méthylène (réductase préincubée: incubation préalable à 32°C /11 h).
<b>Domaine d'application :</b>	Contrôle de la qualité du lait de producteur, statut bactériologique du lait de chaudière (contrôle de fabrication).
<b>Indication :</b>	Indicateur de la contamination du lait par des germes se multipliant rapidement.
<b>Limites :</b>	Dépend de l'oxygénation du lait. Dépend de la composition de la flore.
<b>Exigences :</b>	Temps de décoloration (lait de fromagerie): - Réductase normale > 6 h - Réductase préincubée > 15 min

Lors du test de la réductase, la charge en germes du lait est mesurée indirectement par la diminution du potentiel Redox, qui résulte de l'activité métabolique. Exprimé plus simplement: Les microorganismes consomment l'oxygène du lait. Enfin, le bleu de méthylène est réduit et le lait se décolore. De propres enzymes et d'autres composants du lait tels que la vitamine C, la riboflavine et le cuivre mais également la lumière ont un impact sur la réduction du bleu de méthylène. De plus, les différents microorganismes présentent également des grandes différences par rapport à leur capacité à décolorer le bleu de méthylène

Comme on peut le voir ci-dessus, les lactocoques et les coliformes engendrent une réductase plus rapide que d'autres germes. L'activité métabolique et la vitesse de croissance différente en sont la cause. Cela signifie que des échantillons de lait avec une durée de réductase identique peuvent se différencier par rapport au nombre de germes. En effet, un lait contenant 50'000 germes par ml peut dans certaines conditions, avec une composition spécifique de la flore microbienne, avoir une durée de réductase identique à un lait contenant 250'000 germes par ml.

**Tableau 2:** Réaction de différents groupes de germes au test de la réductase

#### Réaction lors de la réductase

<b>Forte</b>	<b>Moyenne</b>	<b>Faible</b>
Germes coliformes	Staphylocoques	Sporulés anaérobies
Entérocoques	Streptococcus salivarius ssp. thermophilus	Pseudomonades
Lactocoques	Lactobacilles Bacillus sp.	Bacillus cereus

La réductase préincubée a fait ses preuves en tant que contrôle du processus de fabrication. Le lait avec une durée de décoloration courte est souvent mûr et provoque un séchage rapide du grain de caillé et ensuite des défauts du fromage tels que des défauts au niveau du goût et de la pâte ainsi qu'une durée de conservation insuffisante.

### 3.2 Degré d'acidité du lait (11 h à 38°C)

Cette analyse permet de déterminer l'activité métabolique de microorganismes acidifiants par titration de l'acidité.

<b>Méthode / définition :</b>	Degré d'acidité (°SH) après incubation du lait à 38°C/11h
<b>Domaine d'application :</b>	Contrôle de la qualité du lait des producteurs, statut bactériologique du lait de chaudière (contrôle de fabrication)
<b>Indication :</b>	Charge du lait en bactéries lactiques
<b>Exigences :</b>	Lait de fromagerie < 15 °SH

Le lait avec un degré d'acidité élevé contient souvent des bactéries lactiques indésirables, qui ont souvent un effet défavorable sur la qualité du fromage. Il faut s'attendre à avoir des défauts au niveau de l'ouverture et de la pâte comme des lainures, une pâte courte et blanchâtre comme le montre l'exemple suivant (tabl. 3).

**Tableau 3:** Influence de bactéries lactiques indésirables sur la qualité du fromage (Emmentaler AOC). Résultats dans un fromage de 3 mois

Paramètres d'essai	[unité]	Mélange de cultures A	Mélange de cultures B	
<i>Particularité</i>		<b>aucune</b>	<b>Contamination, acidification trop forte</b>	
Acidité de la culture	°SH	49-54	67-72	
Eau	[g/kg]	367	373	
Tefd	[g/kg]	541	548	
Acides carboxyliques volatils totaux.	[mmol/kg]	90.6	100	
Acide formique	[mol-%]	4.0	3.9	
Acide acétique	[mol-%]	42.8	41.2	
Acide propionique	[mol-%]	52.4	54.3	
Acide butyrique	[mol-%]	0.3	0.4	
Acide caproïque	[mol-%]	0.1	0.1	Valeur de référence
Acides aminés libres (OPA)	[mmol/kg]	<b>105</b>	<b>286</b>	< 160
Qualité du fromage		<b>Belle ouverture, pâte de très bonne qualité.</b>	<b>Nids, pâte courte et blanchâtre.</b>	

### 3.3 Epreuve du lactofermentateur

Outre le test d'acidification et la réductase préincubée, l'épreuve du lactofermentateur convient très bien pour le contrôle microbiologique du lait dans la fromagerie.

<b>Méthode / définition :</b>	Appréciation visuelle de la fermentation du lait cru après incubation à 38°C pendant 12 h et 24 h.
<b>Domaine d'application :</b>	Contrôle de la qualité du lait des producteurs, statut bactériologique du lait de chaudière (contrôle de fabrication).
<b>Indication :</b>	Test pratique simple très efficace. Indication concernant la composition de la microflore capable de se reproduire dans le lait cru. Identification de laits dont la flore peut porter préjudice au fromage.
<b>Exigences :</b>	Liquide à 12 h Liquide ou gélatineux à 24 h (Attention : si les échantillons sont contaminés par des antibiotiques, ils sont également liquides après 24h)

La combinaison épreuve du lactofermentateur-réductase n'est pas recommandée car le bleu de méthylène peut influencer l'appréciation du lactofermentateur.

Une épreuve du lactofermentateur idéale est encore liquide après 12 heures et présente un caillé gélatineux après 24h sans séparation de petit-lait („caséeux“), flo-

culation („floconneux“) ou formation de gaz. Le tableau 4 montre jusqu'à quel point la microflore d'un échantillon de lait avec un type de fermentation indésirable peut se différencier d'un lait normal. Lors de ce petit essai, on a analysé microbiologiquement des épreuves du lactofermentateur à 24 heures issus d'une fromagerie.

**Tableau 4:** Analyse microbiologique d'échantillons avec différents types de fermentation

Aspect	Germes étrangers	Lactobacilles	Entérobactériacées	Escherichia coli	Entérocoques	Germes halotolérants	Levures	Germes protéolytiques
<b>gélatineux</b>	++	+	+	-	+	-	-	+
<b>floconneux</b>	+++(+)	++++	+++	-	+	+	-	+++(+)
<b>caséeux</b>	++++	++++	+++	++	+	++	-	++++
<b>gonflant</b>	+++(+)	+++(+)	+++	+++	-	-	-	+++(+)

- <100'000  
 + 100'000-1'000'000  
 ++ 1 - million  
 +++ 10 - 100 millions  
 ++++ > 100 millions

Conclusion pour le fromager:

Le lait qui, après 24 heures, présente un aspect caséeux ou floconneux, contient beaucoup plus de germes protéolytiques actifs pouvant engendrer des défauts de goût ou d'ouverture.

### 3.4 Charge en germes du lait commercialisé (selon Ordonnance sur la qualité du lait - OQL)

<b>Méthode / définition :</b>	Charge en germes du lait (dénombrement par fluorescence optique) Les cellules bactériennes sont marquées à l'aide d'une substance appelée fluoro-chrome et ensuite détectées par voie opto-électronique (méthode Bactoscan). Les valeurs mesurées sont converties ensuite en UFC/ml, c'est-à-dire dans l'unité de la méthode de référence. (voir 4.1)
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru et lait de brebis et de chèvre
<b>Indication :</b>	Mesure pour la charge globale de cellules bactériennes en tout genre
<b>Limites :</b>	Les cellules bactériennes mortes et les autres incapables de se reproduire sont également dénombrées Indiquée uniquement pour les échantillons liquides.
<b>Exigences :</b>	Pour le lait commercialisé, conformément à l'article 8 de l'OHyPL (Etat le 1er mars 2008) : Lait de vache: < 80'000 germes/ml Lait cru d'autres mammifères : < 1 500 000 germes/ml ou < 500 000 germes/ml si le lait est destiné à la fabrication de produits à base de lait cru sans traitement thermique. Selon une étude d'ALP sur la transformation du lait de brebis et de chèvre, nous considérons que les limites fixées par l'OHyPL sont beaucoup trop élevées. L'étude a montré que, lors d'un respect des règles d'hygiène de production laitière, la valeur de 200'000 germes/ml n'est pas être dépassée.

<sup>1</sup> Production de lait de chèvre et de brebis: La qualité s'avère payante. ALP actuel, no 29, 2007.

En Suisse, depuis 1998, on utilise uniquement le dénombrement de germes instrumental pour le contrôle de la qualité du lait commercialisé (fig. 1), qui est nettement plus avantageux que la méthode classique sur plaques d'agar.

Cependant, la méthode classique (voir 4.1 „Germes aérobies mésophiles“) demeure importante en tant que méthode de référence. Afin de garantir la comparabilité des résultats, on convertit les données d'impulsions résultant du dénombrement de germes par fluorescence optique en unités formant des colonies (UFC/ml).

La méthode du Bactoscan est très fiable et convient pour cette raison très bien pour le paiement du lait selon la qualité. Cependant, le nombre d'impulsions ne fournit pas d'indications concernant la contamination du lait par des germes indésirables. C'est pourquoi les méthodes pratiques qui ont fait leurs preuves et les méthodes de laboratoire microbiologiques classiques demeurent importantes.



**Fig. 1:** Dénombrement entièrement automatique de germes dans le lait grâce au Bactoscan (photo: Foss, DK)

## 4 Paramètres microbiologiques classiques

### 4.1 Germes aérobies mésophiles (GAM)

<b>Méthode / définition :</b>	Milieu de culture : Plate Count Agar (synonyme : Standard Method Agar, Gélose pour dénombrement) Dénombrement de colonies après 3 jours d'incubation aérobie à 30°C Référence : MSDA, Edition 2004 chapitre 56, méthode E.1
<b>Domaine d'application :</b>	En général pour les matières premières et les denrées alimentaires non fermentées.
<b>Indication :</b>	Mesure de la charge en germes aérobies et facultatifs.
<b>Limites :</b>	Les germes qui ne sont pas en mesure de former en l'espace de 3 jours des colonies visibles à l'œil nu ne sont pas répertoriés.
<b>Exigences :</b>	Valeurs limites conformément à l'article 48 de l'OHyg: - Lait de vache cru avant la transformation: 300'000 UFC/ml. - Lait traité par la chaleur pour la fabrication de produits laitiers: 100'000 UFC/ml. - Crème de lait livré à l'industrie : 300'000 UFC/ml

En ce qui concerne les **aliments non fermentés**, le nombre de germes aérobies mésophiles représente le principal critère d'hygiène et microbiologique: si le nombre de germes dépasse 10 millions UFC/g, il faut s'attendre à de premières modifications sensoriellement perceptibles. A partir d'un nombre de germes de 100 millions/g, l'aliment doit être qualifié d'avarié.

> En ce qui concerne les **denrées alimentaires fermentées**, la détermination du nombre de germes aérobies mésophiles n'a pas de sens. Les résultats ne sont pas fiables et sont très difficiles à interpréter.



**Fig. 2:**

Détermination de germes aérobies mésophiles selon le MSDA. Les colonies visibles après 3 jours d'incubation à 30°C sont comptées.

## 4.2 Germes étrangers aérobies mésophiles

<b>Synonyme :</b>	Nombre de germes étrangers.
<b>Méthode / définition :</b>	Milieu de culture avec Sugar Free Agar + pénicilline. Dénombrement de colonies après 3 jours d'incubation aérobie à 30°C. Réf. : MSDA, Edition 1985, chapitre 56, méthode 7.03.
<b>Domaine d'application :</b>	Denrées alimentaires fermentées.
<b>Indication :</b>	Germes étrangers. Ce sont surtout les agents d'altération gram-négatifs (pseudomonades, entérobactériacées, etc.) qui sont mis en évidence. Les bactéries lactiques et en majeure partie les levures sont inhibées.
<b>Limites :</b>	Les germes étrangers gram positifs ainsi que les germes gram négatifs fastidieux sont inhibés.
<b>Exigences :</b>	Lait de chaudière : < 20'000 UFC/ml

**Attention:** pour déterminer le nombre de germes étrangers aérobies mésophiles, il existe une **variante sans ajout de pénicilline**. Le milieu de culture sans antibiotique présente la plupart du temps un nombre de germes plus élevé (la pénicilline inhibe pratiquement tous les germes gram positifs). C'est la raison pour laquelle, lors de l'octroi d'un mandat d'analyse et lors de l'interprétation des résultats, il faut toujours clarifier de manière précise quelle méthode doit être utilisée.

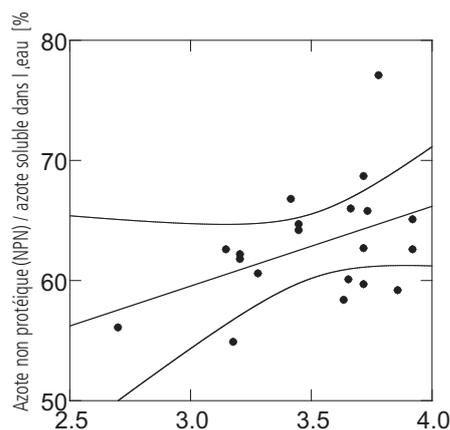
### 4.3 Germes halotolérants

<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonie sur Mannitol-Salt-Agar (7,5 % NaCl) après incubation à 37°C pendant 2 jours.
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru, bain de sel, contrôles par étapes dans la fromagerie.
<b>Indication :</b>	Sont dénombrés: microcoques, staphylocoques, entérocoques, levures halotolérantes, certains sporulés aérobies ainsi que des bactéries typiques de la morge (Brevibacterium & Arthrobacter). Elevée en cas d'hygiène de traite lacunaire.
<b>Sources de contamination :</b>	Peau, pis, fèces, poussière, morge.
<b>Exigences :</b>	Lait de chaudière: < 5000 UFC / ml Lait du producteur: < 5000 UFC / ml

La teneur en germes halotolérants est un critère de qualité utilisé depuis des décennies pour le lait cru et qui est spécifié encore aujourd'hui dans quelques contrats d'achat du lait. En effet, des teneurs élevées en germes halotolérants indiquent souvent que le nettoyage de la mamelle est insuffisant. On trouve souvent de nombreux germes halotolérants sur la peau et sur le pelage ou sont présents dans l'intestin (entérocoques). Des mammites peuvent aussi se manifester au travers de valeurs élevées, en particulier lors d'infections avec des staphylocoques.

Les germes halotolérants présentent en général une assez **grande résistance** à la sécheresse et à des teneurs en sel élevées, bien qu'ils ne soient pas des sporulés. Il n'est pas rare qu'ils résistent aussi à l'acidité et à la chaleur. En particulier ils résistent bien à la thermisation.

De nombreux germes halotolérants sont de **puissants protéolytes** et favorisent la protéolyse en profondeur dans le fromage, ce qui a souvent un impact négatif sur la qualité du fromage (pâte courte, lainure). Cette constatation faite lors de consultations et d'essais a également été confirmée lors d'une enquête réalisée auprès de 30 fromageries fabricant de l'Emmentaler. Le diagramme de la figure 3 montre que plus la teneur en germes halotolérants est élevée dans le lait de chaudière, plus la teneur en NPN est élevée dans le fromage mûr, ce qui signifie une protéolyse plus avancée.



Germes halotolérants dans le lait de chaudière [log UFC/ml]

**Fig. 3:**

Teneur en germes halotolérants du lait de chaudière et protéolyse en profondeur (NPN) dans l'Emmentaler.

Dans les Emmentaler de 3 et 6 mois, la teneur en germes halotolérants du lait de chaudière a eu un impact négatif sur les critères de qualité suivants:

- Aptitude à la conservation
- Ouverture
- Pâte

**Tableau 5:** deux exemples relatifs aux germes halotolérants lors d'un contrôle par étapes dans des fromageries présentant des problèmes de qualité.

Type de fromage	Fromages à pâte mi-dure (thermisé)	Emmentaler
<b>Problème</b>	<b>Becs, grosses ouvertures</b>	<b>Nids, pâte blanche et courte</b>
Endroit du prélèvement		
- Bassin / Tank	4'150	5'250 ↑
- Lait de chaudière	1'850	3'950
- Caillé	20'600 ↑	> 300'000 ↑↑
- Lactosérum au moulage	225	1'400 ↑
- Fromage à 1 jour	91'000 ↑↑	2'800 ↑

#### Conclusion pour le fromager:

> Des teneurs élevées en germes halotolérants augmentent le risque de fermentations indésirables dans le fromage.

#### 4.4 Germes psychrotrophes

<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonies sur Standard-Agar avec 0,1 % de lait écrémé en poudre, après 10 jours d'incubation à 6,5°C.
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru, lait pasteurisé.
<b>Indication :</b>	Germes végétatifs se développant à < 7°C, c'est-à-dire la flore psychrotrophe (pseudomonas, div. entérobactéries et genres de bacilles, levures, etc.).
<b>Sources de contamination :</b>	Conduites, pompes, boilles pas sèches, eau, saleté.
<b>Exigences :</b>	Lait de chaudière : < 5'000 UFC / ml

Parmi les germes psychrotrophes, on trouve de nombreux lipolytes et protéolytes dont les enzymes sont très actives et en partie aussi fortement thermorésistantes. Lors de la fabrication de fromage, les germes psychro-

trophes sont indésirables en raison de leur impact négatif sur le goût. En général, les germes psychrotrophes forment peu d'acidité.

#### 4.5 Germes lipolytiques (lipolytes)

<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonies sur Crossley Agar avec de la graisse de beurre (étalement en surface) après 72 h d'incubation aérobie à 30°C. Les colonies entourées d'un halo clair sont considérées comme germes lipolytiques.
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru, beurre.
<b>Indication :</b>	Lipolytes types: pseudomonas, levures, div. espèces de bacilles et quelques entérobactériacées. Des teneurs élevées en lipolytes sont synonymes d'un risque élevé de formation d'un goût rance.
<b>Sources de contamination :</b>	Voir -> germes psychrotrophes
<b>Exigences :</b>	Lait de producteur ou lait de chaudière : < 3000 UFC/g

La méthode sert au dénombrement de germes lipolytiques (lipolytes) dans le lait et les produits laitiers. Ces germes peuvent engendrer un goût rance dans le fromage, le beurre, la crème et d'autres produits laitiers contenant de la matière grasse. Les pseudomonas, qui

sont en partie de puissants lipolytes, forment des lipases extrêmement résistantes à la chaleur. C'est la raison pour laquelle, lors d'une forte contamination du lait cru (stockage de longue durée au froid!), même des produits UHT deviennent rances avec le temps.

#### 4.6 Germes protéolytiques

<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonies sur un agar de caséinate de calcium selon Frazier et Rupp après 3 jours d'incubation aérobie à 30°C. Les colonies entourées d'un halo clair sont considérées comme germes protéolytiques.
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru
<b>Indication :</b>	Nombreuses espèces de bacilles, pseudomonas, divers germes halotolérants et Lb. helveticus sont de puissants protéolytes
<b>Sources de contamination :</b>	Voir -> germes psychrotrophes

Les protéolytes sont responsables du défaut « caséux » lors de l'épreuve du lactofermentateur et peuvent avoir un impact négatif sur la dégradation des protéines dans le fromage, par ex. la formation d'un goût amer, une protéolyse excessive ou favoriser la formation d'amines

biogènes. Les protéases de certains protéolytes résistent très bien à la chaleur et peuvent provoquer une légère coagulation du lait UHT.

## 5 Détermination sélective de types de germes définis

### 5.1 Sporulées aérobies (Bacillus)

<b>Méthode / définition :</b>	Pasteurisation de l'échantillon à 75°C/15 min. Ensuite dénombrement de colonies sur agar standard (Plate Count Agar) avec de la caséine. Incubation pendant 3 jours à 30°C. Réf. : MSDA, Edition 1985, chapitre 56, méthode 7.02.
<b>Domaine d'application :</b>	Lait, produits laitiers liquides.
<b>Indication :</b>	Spores de l'espèce Bacillus, hygiène de traite (poussière de foin, poussière).
<b>Sources de contamination :</b>	Foin, sol, air. Risque de contamination important lors d'affouragement de foin pendant la traite, aspiration de saleté lors de la pose de faisceaux-trayeurs („aspirateur“).
<b>Limites :</b>	Les cellules végétatives de germes sporulés ne sont pas répertoriées à cause du traitement thermique de l'échantillon lors de l'analyse.

Les sporulées aérobies sont de loin (mis à part les germes de recontamination typiques pseudomonas et entérobactéries) les principaux agents d'altération des produits laitiers pasteurisés, car ils sont souvent psychrotrophes. Bacillus cereus, un agent pathogène responsable d'intoxications alimentaires, fait aussi partie de ce groupe.

Dans les fromageries, des teneurs élevées dans le lait de chaudière sont indésirables car les enzymes ont un impact négatif sur la dégradation des protéines (voir protéolytes). Cependant, contrairement aux spores anaérobies, les spores aérobies sont peu importantes du point de vue de la technologie fromagère car ils peuvent à peine se multiplier dans le fromage.

## 5.2 Sporulées anaérobies / bacilles butyriques (méthode MPN ALP)

Les spores anaérobies sont les germes qui sont responsables des principaux dommages financiers dans les fromageries causés par des germes non pathogènes : les agents responsables de la fermentation butyrique (*Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum*) et de la fermentation putréfiante (*Cl. sporogenes*). 10 spores par litre de lait suffisent dans certaines conditions à provoquer un gonflement du fromage.

En Suisse, pour la recherche des spores anaérobies dommageables pour le fromage, on utilise surtout deux méthodes, ladite méthode MPN (NPP) plus ancienne et moins sélective et la méthode de filtration plus récente décrite ci-après et qui permet une détermination sélective de *Cl. tyrobutyricum*.

MPN signifie Most Probable Number (= nombre le plus probable, NPP), c'est une méthode statistique très utilisée en microbiologie pour l'évaluation d'un nombre de germes. La méthode MPN peut être appliquée pour le dénombrement de presque chaque type de germe. Dans l'industrie laitière, la „méthode MPN“ est synonyme de détermination des spores anaérobies selon la méthode décrite ici.

<b>Méthode / définition :</b>	Estimation du nombre de spores avec un milieu de dextrose/pommes de terre dans des tubes (méthode MPN) après pasteurisation à 75°C/15 min. Incubation anaérobie pendant 9 jours à 37°C. Tous les tubes présentant une formation claire de gaz sont répertoriés.
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru (vache, brebis, chèvre, bufflonne) frais ou congelé, lait de chaudière, fromage.
<b>Indication :</b>	Recense toutes les spores formant du gaz et croissant en absence d'oxygène, en particulier <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Clostridium tyrobutyricum</i> , <i>Clostridium bifermentans</i> . Bon indicateur de l'hygiène générale de l'étable et de la traite.
<b>Sources de contamination :</b>	Ensilage, fourrage vert en fermentation, excréments, bourbe, foin souillé par de la terre, poussières etc.
<b>Limites :</b>	Pas de différenciation possible entre les spores nuisibles pour la fromagerie et les autres spores formant du gaz. La méthode fournit des valeurs au moins 4 x plus élevées que la méthode de filtration mais davantage de résultats „faux-positifs“.
<b>Remarque :</b>	Egalement appropriée pour des types d'échantillons difficiles voire impossibles à filtrer (par ex. lait congelé, lait de brebis, lait de bufflonne, fromage)
<b>Exigences ALP :</b>	Méthode MPN ALP : Lait de chaudière: < 140 spores par litre Lait de producteur: < 200 spores par litre Eau: < 50 spores par litre

Pour les genres d'échantillons non filtrables, la méthode MPN est pratiquement l'unique méthode permettant de déterminer les spores anaérobies avec suffisamment de sensibilité.

Pour le lait, ALP utilise la méthode MPN en format 3x4, 4 tubes d'un milieu de pommes de terre/dextrose inoculés à chaque fois avec 6 ml de lait, 4 autres avec 3 ml et encore 4 autres avec 1 ml. Cela débouche sur une limite de détection de 25 spores par litre. Dans la pratique, on trouve cependant aussi des variantes de la méthode simplifiées avec moins de tubes. Toutefois, ces méthodes simplifiées sont moins sensibles (seuil de détection plus élevé) et moins précises.

A part la méthode ALP, on utilise en Suisse d'autres méthodes MPN pour la recherche de spores butyriques. Celles-ci utilisent des milieux semblables et prêts à l'emploi. Un de ces milieux est le milieu standard pour les clostridies, le « Reinforced Clostridium Bouillon ». L'autre milieu sert à la recherche des clostridies fermentant le lactate dans les ensilages et le lait. Il se nomme «Bouillon de Bryant et Burkey» et contient de la résazurine (Biokar diagnostics ou Merck AG).

Le test MRCM, utilisé dans quelques fromageries, est semblable à la „méthode MPN“ et est disponible auprès des distributeurs d'équipement laitier (Foodtech AG, 8610 Uster). Cependant, le test est souvent effectué dans des tubes de 10 ml. Il sert seulement à analyser s'il y a absence ou présence de spores dans 10 ml (Limite de détection: 100 spores par litre).

Le test MRCM semble cependant un peu plus sélectif par rapport à *Cl. tyrobutyricum* que la „méthode MPN“ décrite.

#### **Important pour la pratique:**

Les différents milieux qui sont utilisés pour les méthodes MPN se différencient par la quantité de spores mesurées. C'est pourquoi la valeur limite de charges en spores du lait doit être définie différemment pour chaque méthode MPN. Pour cette raison, une unification des méthodes serait souhaitée.

### 5.3 Clostridium tyrobutyricum (méthode par filtration)

Clostridium tyrobutyricum est l'agent nuisible responsable de la fermentation butyrique (gonflement tardif) qui apparaît de façon typique après 6-8 semaines de maturation. En ce qui concerne les fromages à pâte dure,

Cl. tyrobutyricum est clairement l'ennemi numéro un. C'est la raison pour laquelle ALP a développé, au cours des années 90, une méthode de détermination sélective du germe: la méthode de filtration selon Bourgeois & Casey (fig. 4).

<b>Méthode / définition :</b>	Filtration sur membrane de 40 ml de lait après la pasteurisation à 75°C/15 min et le traitement enzymatique de l'échantillon. Les filtres sont placés sur de l'agar RCM modifié et sont incubés par anaérobiose pendant 3 jours à 37°C.
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru (vache), lait de chaudière, eau.
<b>Indication :</b>	Toutes les clostridies préjudiciables pour les fromageries croissent sur l'agar. A l'aide de l'odeur et des caractéristiques des colonies, on peut différencier et dénombrer de manière sélective Cl. tyrobutyricum.
<b>Sources de contamination :</b>	voir 5.2
<b>Limites :</b>	Pas appropriée pour les échantillons non filtrables tels que lait de brebis et de bufflonne (viscosité), lait floconneux ou échantillons fermes.
<b>Remarque :</b>	Moins significatif que la „méthode MPN“ par rapport à l'hygiène de traite.
<b>Exigences ALP :</b>	Lait de chaudière: < 25 spores par litre Lait de producteur: < 25 spores par litre

La méthode de filtration très répandue a fait ses preuves lors de la surveillance habituelle de lait de chaudière et de producteur à l'état frais. Lors de l'analyse d'échantillons de contrôle congelés en cas de dommage, on recommande néanmoins d'utiliser la „méthode MPN“ et ceci pour les raisons suivantes:

- Les floculations dues à la congélation peuvent provoquer des problèmes lors de la filtration mais n'engendrent par contre pas de problèmes avec la „méthode MPN“.
- Du point de vue de la technique de laboratoire, la méthode MPN est plus fiable (anaérobiose!).
- Les spores germent plus facilement dans le milieu de cette culture liquide de la méthode MPN.
- Le risque de trouver des résultats négatifs malgré un gonflement du fromage est moins élevé avec la méthode MPN.

Une étude réalisée par ALP a montré que la congélation des échantillons de lait n'influence pas la viabilité des spores et donc le résultat d'analyse.



**Fig. 4:** Détermination quantitative de Clostridium tyrobutyricum avec la méthode de filtration selon Bourgeois & Casey

## 5.4 Bactéries propioniques

<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonies à l'aide d'un étalement en surface de l'échantillon sur lactate d'agar. Incubation anaérobie pendant 10 jours à 30°C.
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru, fromage.
<b>Indication :</b>	Agents pathogènes responsables de fermentations secondaires surtout pour le Gruyère et le Sbrinz. Les bactéries propioniques peuvent en outre former des points bruns dans la pâte.
<b>Remarque :</b>	Dans les échantillons avec une flore initiale importante et une teneur peu élevée en bactéries propioniques, les résultats du dénombrement ne sont pas fiables et la limite de détection élevée.
<b>Sources de contamination :</b>	Trayons, peau, poils, joints, couches, résidus de lait, fourrage vert en fermentation, ensilage.
<b>Exigences :</b>	Lait de producteur ou de chaudière: - Sbrinz < 10 UFC/g - Gruyère < 20 UFC/g - autres < 30 UFC/g

Même dans l'Emmentaler, pour lequel le lait de chaudière est inoculé avec des bactéries propioniques, des souches sauvages du lait cru peuvent provoquer des problèmes de fermentations secondaires. En effet, il se peut, que le lait soit fortement contaminé par des souches de bactéries propioniques capables de fermenter l'acide asparagique (acide aminé issu de la protéolyse) et qui ne sont pas inhibées par les lactobacilles hétérofermentaires facultatifs. Ce phénomène peut résulter d'une fermentation secondaire au cours de la protéolyse.

Aujourd'hui, certains produits pour les ensilages (par ex. Kofasi® LIFE et AIV Bioprofit) contiennent des bactéries propioniques. Pour les exploitations de production laitière qui en plus élèvent des vaches d'engraissement avec de l'ensilage, le risque de contamination du lait avec des bactéries propionique est élevé.

## 5.5 Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs

Les analyses de lait cru lors de recherche de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs dans le lait sont effectuées avant tout pour la fabrication du Gruyère car, tout comme les bactéries propioniques, elles peuvent provoquer des fermentations secondaires et des lainures.

<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonies à l'aide d'un étalement en surface sur agar sélectif avec mannitol, acétate et vancomycine. Incubation anaérobie pendant 72 h à 37°C.
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru, fromage.
<b>Indication :</b>	Les LHF peuvent faire fermenter du lactose ainsi que du citrate en formant du CO <sub>2</sub> . La fermentation du citrate joue un rôle important lors de la formation d'ouverture dans les fromages à pâte mi-dure mais peut provoquer des lainures dans le Gruyère.
<b>Sources de contamination :</b>	Fourrage vert, ensilage, ustensiles de traite, joints, boilles, culture de petit-lait.
<b>Exigences :</b>	Lait de producteur : < 30 UFC/g Lait de chaudière : < 100 UFC/g

En cas de doute, l'analyse microbiologique des fromages est également préconisée car les fermentations secondaires dues à des lactobacilles hétérofermentaires sont difficilement décelables à l'aide de l'analyse classique par chromatographie en phase gazeuse.

Il existe sur le marché divers agents conservateurs pour l'ensilage favorisant la fermentation lactique et évitant les post-fermentations, mais contenant des LHF.

## 5.6 Lactobacilles hétérofermentaires obligatoires

Autrefois peu examinées, les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires sont désormais au centre des préoccupations, car ils forment dans les fromages à pâte dure de l'histamine et causent des fermentations secondaires.

<b>Méthode / définition :</b>	Le test s'effectue dans des tubes à l'aide du milieu MRS liquide modifié avec mélibiose et raffinose et d'une cloche de Durham. Incubation pendant 3 jours à 37°C (méthode ALP).
<b>Domaine d'application :</b>	Lait cru, fromage.
<b>Indication :</b>	Les lactobacilles hétérofermentaires obligatoires fermentent le sucre et produisent du CO <sub>2</sub> . Ils peuvent être responsables de gonflements précoces, de mille trous, de nids sous croûte et d'une mauvaise ouverture des fromages (trous irréguliers). Les LHO sont non seulement à l'origine des fermentations secondaires et des défauts de goût, mais ils peuvent aussi transformer par exemple l'histidine en histamine indésirable (toxique, fort goût brûlant) en scindant le groupe CO <sub>2</sub> (décarboxylation).
<b>Limites :</b>	La méthode n'est applicable qu'avec réserve à des produits qui, comme le lait cru, peuvent contenir d'autres germes capables de former aussi du gaz dans les conditions sélectives choisies.
<b>Remarque :</b>	Semi-quantitative (<10, <100, ... UFC/ml) ou quantitative (estime du nombre le plus probable NPP/MPN à l'aide de plusieurs tubes).
<b>Sources de contamination :</b>	Fourrage vert fermenté, ensilage, résidus de lait, joints, température de stockage du lait >15°C

Il est rare que l'on effectue des analyses par rapport aux bactéries lactiques hétérofermentaires obligatoires. Cependant, ces germes en nombre suffisamment élevé sont en mesure de former du gaz dans le fromage frais déjà au cours de la dégradation du lactose. De ce fait, les bactéries lactiques hétérofermentaires doivent toujours être prises en considération en tant que responsables d'une ouverture défectueuse.

Il y a sur le marché des additifs pour l'ensilage qui contiennent des lactobacilles hétérofermentaires obligatoires. ALP a testé 5 de ces produits et peut confirmer que les lactobacilles buchneri utilisés ne produisent pas d'histamine. Mais comme les souches sont capables de transformer l'acide lactique en CO<sub>2</sub>, en acide acétique et en propanediol, ils peuvent quand même provoquer des fermentations secondaires.

## 5.7 Entérobactéries

<b>Synonymes</b>	Entérobactériacées, <i>Enterobacteriaceae</i>														
<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonies à l'aide d'un milieu VRBG. Incubation aérobie pendant 24 h à 37°C. Réf. : MSDA, Edition 2004, chapitre 56, méthode E.2														
<b>Domaine d'application :</b>	Toutes les denrées alimentaires.														
<b>Indication :</b>	Les entérobactéries sont thermolabiles et représentent pour cette raison un important indicateur d'hygiène pour les aliments chauffés. Leur présence dans les aliments chauffés indique une recontamination.														
<b>Sources de contamination :</b>	Fourrage vert, fèces, sol, eaux usées, ustensiles impropres, morge / eau de frottage														
<b>Exigences :</b>	<table> <tr> <td>Lait de producteur :</td> <td>&lt; 300 UFC/g</td> </tr> <tr> <td>Lait de chaudière :</td> <td>&lt;500 UFC/g</td> </tr> <tr> <td>Fromage au lait cru avant le bain de sel :</td> <td>&lt; 10'000 UFC/g</td> </tr> <tr> <td>prêt à la consommation:</td> <td>&lt; 100 UFC/g</td> </tr> <tr> <td>Fromage au lait thermisé avant le bain de sel :</td> <td>&lt; 100 UFC/g (pâte)</td> </tr> <tr> <td>prêt à la consommation :</td> <td>&lt; 10 UFC/g (pâte)</td> </tr> <tr> <td>Eau de frottage :</td> <td>&lt; 10'000 UFC/g</td> </tr> </table>	Lait de producteur :	< 300 UFC/g	Lait de chaudière :	<500 UFC/g	Fromage au lait cru avant le bain de sel :	< 10'000 UFC/g	prêt à la consommation:	< 100 UFC/g	Fromage au lait thermisé avant le bain de sel :	< 100 UFC/g (pâte)	prêt à la consommation :	< 10 UFC/g (pâte)	Eau de frottage :	< 10'000 UFC/g
Lait de producteur :	< 300 UFC/g														
Lait de chaudière :	<500 UFC/g														
Fromage au lait cru avant le bain de sel :	< 10'000 UFC/g														
prêt à la consommation:	< 100 UFC/g														
Fromage au lait thermisé avant le bain de sel :	< 100 UFC/g (pâte)														
prêt à la consommation :	< 10 UFC/g (pâte)														
Eau de frottage :	< 10'000 UFC/g														

Les entérobactéries sont une grande famille comprenant différentes sortes de bâtonnets gram négatifs, anaérobies facultatifs et de bâtonnets ne formant pas de spores. En raison de leur nom (grec Enteron = intestin), les entérobactéries sont souvent identifiées à tort comme étant des germes des fèces. Cependant, seule une petite partie des entérobactéries sont des habitants typiques ou exclusifs de l'intestin comme par exemple les salmonelles et > *Escherichia coli*.

Toutes les entérobactéries sont thermolabiles et sont détruites complètement lors de la pasteurisation. Lors de la thermisation du lait à 65°C/15 s les entérobactéries sont très largement éliminées. Comme cela a été mentionné ci-dessus, elles constituent un indicateur d'hygiène important lorsque les aliments sont chauffés. Généralement, les entérobactéries tolèrent peu l'acidité. Par contre, beaucoup d'entre-elles sont psychotropes. Raison pour laquelle elles sont d'importants agents d'altération pour les produits frais non acides.

Dans les fromages à pâte mi-dure au lait thermisé et dans les fromages à pâte dure, après 24 h et une fabrication correcte ainsi qu'une acidification impeccable, on ne trouve pratiquement pas d'entérobactéries et donc bien sûr aucun germe coliforme ou *E. coli*.

La recherche en entérobactéries dans la pâte du Gruyère à 24h suffit pour détecter une éventuelle contamination en entérobactéries pathogènes (salmonelles, germes pathogènes de *E. coli*).

Pour les fromages affinés, des contrôles occasionnels sont conseillés. Une étude d'ALP a montré que dans la pratique, certaines croûtes de fromages sont contaminées à raison de > 1mio d'entérobactérie par g. Ce type de fromage présente des problèmes lors du préemballage.

## 5.8 Indicateurs fécaux

### 5.8.1 Germes coliformes

<b>Synonymes</b>	Dénombrement de colonies à l'aide d'agar VRB et d'autres milieux. Incubation aérobie pendant 24 h à 37°C.
<b>Domaine d'application :</b>	Parfois demander pour les produits d'exportation.
<b>Indication :</b>	Toutes entérobactéries, pouvant fermenter du lactose (par exemple -> <i>Escherichia coli</i> ). Les coliformes peuvent provoquer un gonflement précoce (mille trous) au cours des premières 24 h.
<b>Sources de contamination :</b>	Fèces, résidus de lait, environnement dans la fromagerie, eaux usées.
<b>Exigences :</b>	Voir 5.8.2 <i>Escherichia coli</i>

En leur qualité de germes coliformes, ils sont qualifiés comme faisant partie de la famille des entérobactéries, pouvant fermenter du lactose. Comme le laisse deviner le nom, la détermination des coliformes est en fait axée sur le germe fécal > *Escherichia coli*. Cependant, quelques autres entérobactéries consomment aussi du lactose (par ex. *Citrobacter freundii*).

En Suisse, il y a plus de 20 ans que les germes coliformes ont perdu une grande partie de leur importance en tant que critère microbiologique car on dispose de milieux de culture pour la détermination d'*E. coli*. Cependant, dans certains pays exportateurs, on trouve encore le critère „Coliformes“ sur des spécifications de produits ou des normes.

## 5.8.2 Escherichia coli

<b>Synonymes :</b>	Colibactéries, E. coli
<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonies à l'aide d'agar chromogène E.coli. Incubation aérobie pendant 24 h à 44°C. Réf. : MSDA, Edition 2004, chapitre 56, méthode E.3
<b>Domaine d'application :</b>	Tous les aliments, eau potable.
<b>Indication :</b>	Indicateur de contamination par des fèces, hygiène de traite, hygiène de production.
<b>Remarques :</b>	Des teneurs élevées dans le lait cru peuvent provoquer un gonflement précoce au cours des premières 24 h. <i>E. coli</i> est thermophile et ne se développe pratiquement pas au-dessous de 8°C.
<b>Sources de contamination :</b>	Intestin des animaux à sang chaud, fèces, lisier.
<b>Exigences :</b>	Lait de producteur : < 50 UFC/g Lait de mélange : < 30 UFC/g Lait de chaudière : < 50 UFC/g (à l'emprésurage) Fromage : voir chap 9

Dans le domaine de la microbiologie des denrées alimentaires, *E. coli* sert en général d'indicateur de contaminations fécales. En fabrication fromagère, on rencontre les colibactéries surtout en tant qu'agent causal du défaut «mille trous». Ceci pouvant être dû soit à une contamination excessive du lait, soit à un stockage du lait à une température trop élevée ou encore à une mauvaise acidification due à la présence de substances inhibitrices.

Depuis le 1er avril 2008, l'ordonnance sur l'hygiène n'exige que le contrôle d'*E. coli* s'effectue au cours du processus de fabrication. Pour les fromages à pâte mi-dure, le contrôle se fait dans le fromage avant le bain de sel. En ce qui concerne les fromages au lait cru ou partiellement thermisés, le contrôle s'effectue dans le fromage après le bain de sel et pour les fromages à pâte molle au lait thermisé ou pasteurisé, il se fait lors de la vente.

### 5.8.3 Entérocoques

<b>Synonymes :</b>	Streptocoques fécaux, streptocoques D
<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonies à l'aide d'agar à la kanamycine, à l'esculine et à l'azide ou à l'aide d'agar Slanetz-Bartley. Incubation aérobie pendant 24 h ou 48 h à 37°C. Réf - MSDA, Edition 1984 chapitre 56, méthode 7.11 (application générale) - MSDA, Edition 2004, chapitre 56, méthode E.15 (eau)
<b>Domaine d'application :</b>	Tous les aliments, eau potable.
<b>Indication :</b>	Dans l'eau potable les entérocoques servent comme indicateur de souillures fécales. Les entérocoques sont souvent capable de fermenter l'acide aminé tyrosine qui est transformé en CO2 et tyramine (amine biogène indésirable). Cette réaction peut provoquer des laitures et donc compromettre la conservabilité du fromage. En outre, les entérocoques peuvent susciter des changements de couleur de la pâte.
<b>Remarques :</b>	Les entérocoques font partie des bactéries lactiques. Ils sont très résistants et sont des germes halotolérants.
<b>Sources de contamination :</b>	Fèces, lisier.
<b>Exigences :</b>	Eau : n.d. dans 100 ml Emmentaler 24 h : <1'000 UFC/g Gruyère 24 h : < 100 UFC/g

Tout comme E. coli, les entérocoques servent en microbiologie alimentaire comme indicateur d'une contamination fécale. Etant donné que les entérocoques sont plus résistants qu'E. coli à la température, à la sécheresse et à d'autres influences, leur recherche se fait surtout dans les produits déshydratés (par ex. lait en poudre). Cepen-

dant, après une contamination fécale de l'eau potable, des entérocoques peuvent survivre plus longtemps qu'E. coli dans le réseau de distribution.

Dans les fromages au lait cru, les entérocoques sont relativement souvent présents en concentration élevées.

## 5.9 Staphylocoques à coagulase positive

<b>Synonymes :</b>	Staphylococcus aureus (majoritairement)
<b>Méthode / définition :</b>	Dénombrement de colonie à l'aide d'agar Baird Parker avec plasma de lapin et fibrinogène (étalement en surface). Incubation aérobie pendant 48 h à 37°C. Réf. : MSDA, Edition 2004, chapitre 56, méthode E.6
<b>Domaine d'application :</b>	Tous les aliments.
<b>Indication :</b>	Lait cru: indicateur de la santé des mamelles, Produits: critère de sécurité alimentaire (risque de formation de toxines si > 100'000 germes/g).
<b>Remarques :</b>	Les staphylocoques font partie des germes halotolérants.
<b>Sources de contamination :</b>	Pis malade, plaies, muqueuses
<b>Exigences :</b>	Lait de producteur < 300 UFC/g Lait de chaudière < 100 UFC/g Fromage : voir chap 9

Les staphylocoques à coagulase positive sont pratiquement toujours décelables dans le lait de chaudière. En général, ils proviennent de vaches souffrant d'une mammité subclinique ou aiguë. Normalement, le nombre de germes dans le lait de mélange se situe en-dessous de 100 UFC/g. Toutefois, ALP a déjà observé des échantillons de lait de producteur contenant plus de 1 million de staphylocoques à coagulase positive par ml ! Malgré la probable dilution avec un autre lait, un tel lait présente un risque du point de vue de la sécurité alimentaire. Selon le stockage du lait, son traitement et la courbe de la température au cours de la fabrication, les staphylocoques peuvent être multipliés par un facteur 10. En outre, les germes se concentrent dans le caillé (augmentation du nombre de germes par un facteur 10). Si de plus des staphylocoques atteignent un nombre de germes de  $10^5$ /g ou un nombre supérieur à un moment de la fabrication, il existe un risque d'intoxication alimentaire. Les staphylocoques meurent certes

au cours de la maturation des fromages à pâte dure et mi-dure mais les toxines demeurent dans la pâte. C'est la raison pour laquelle, dans la révision de l'ordonnance sur l'hygiène en 2008, au lieu de contrôles des produits finis, on a défini des critères d'hygiène du procédé pour les staphylocoques à coagulase positive.

Depuis avril 2008, le fromager ne surveille plus les staphylocoques à coagulase positive dans le produit fini mais à l'aide d'échantillons qu'il prélève au moment où l'enrichissement en germes est maximal. En ce qui concerne le fromage à pâte dure, des échantillons sont prélevés lors de l'atteinte de la température de chauffage du grain alors que pour les autres fromages le prélèvement s'effectue avant le bain de sel.

**Critères d'hygiène du procédé pour les staphylocoques à coagulase positive:** Voir chap.9

## 6 Défauts du fromage provoqués par des germes nuisibles

	Germes étrangers	Entérobactériacées	Escherichia coli	Entérocoques	Germes halotolérants	Bactéries propioniques	Lb. hétéroferm. obligatoires	Lb. hétéroferm. facultatifs	Levures	Cl. butyricum	Cl. tyrobutyricum	Spores anaérobies (Clostridies)	Germes lipolytiques	Germes protéolytiques	Germes psychrotrophes
<b>Défauts d'ouverture</b>															
Nids							+	+	+	+					
Nids sous croûte							+		+						
Mille trous	+	+	+						+						
Gonflement précoce	+	+	+				+	+	+	+		+			
Ouverture défectueuse	+	+	+				+		+	+					
Gonflement tardif				+		+	+			+	+	+			
Lainure	+			+	+	+	+	+				+		+	
<b>Défauts de goût</b>															
Brûlant, piquant					+		+	+				+		+	
Amer	+			+	+				+					+	+
Goût de rance	+								+	+	+	+	+		+
Doucereux						+								+	
Goût impur	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Défaut de la pâte</b>															
Points bruns						+									
Pâte rouge (fromage à pâte molle)	+	+		+	+										+
Blanche et courte				+	+										+
Courte				+	+										+
Altérations de la couleur	+			+	+										+

### Mode de lecture du tableau:

1) **Mille trous:** ce défaut peut avoir été provoqué par les germes ou les groupes de germes suivants: germes étrangers, entérobactériacées, E. coli ou levures.

2) **Bactéries propioniques:** peuvent provoquer un gonflement tardif, des lainures, un goût doux et des points bruns dans la pâte.

## 7 Valeurs de référence pour les matières premières et les produits semi-finis

### 7.1 Lait du producteur

Charge en germes	<	80'000	UFC/ml
Germes étrangers (pas sporulés)	<	20'000	UFC/g
Germes aérobies mésophiles	<	30'000	UFC/g
Staphylocoques à coagulase positive	<	300	UFC/g
Entérobactériacées	<	300	UFC/g
Escherichia coli	<	50	UFC/g
Germes halotolérants	<	5'000	UFC/g
Bactéries propioniques :			
- Sbrinz	<	10	UFC/g
- Gruyère	<	20	UFC/g
- autres	<	30	UFC/g
Sporulées anaérobies (MPN)	<	200	Spores/l
Cl. tyrobutyricum (filtration)	<	25	Spores/l
Germes lipolytiques	<	3'000	UFC/g
Germes psychrotrophes	<	3'000	UFC/g
Lactobacilles hétéroferm. facultatifs	<	30	UFC/g

### 7.2 Lait de chaudière

Germes aérobies mésophiles (avant l'apport de cultures):			
- lait cru	<	300'000	UFC/g
- lait traité thermiquement	<	100'000	UFC/g
Staphylocoques à coagulase positive	<	100	UFC/g
Escherichia coli	<	50	UFC/g
Entérobactériacées	<	500	UFC/g
Germes halotolérants	<	5'000	UFC/g
Bactéries propioniques	<	10	UFC/g
Spores anaérobies (MPN)	<	140	Spores/l
Cl. tyrobutyricum (filtration)	<	25	Spores/l
Germes lipolytiques	<	3'000	UFC/g
Germes psychrotrophes	<	5'000	UFC/g

### 7.3 Gruyère (après chauffage)

Germes étrangers aérobies mésophiles	<	1'500	UFC/g
Germes halotolérants	<	500	UFC/g
Bactéries propioniques	<	10	UFC/g
Entérocoques	<	100	UFC/g
Lactobacilles hétéroferm. facultatifs	<	100	UFC/g

## 8 Valeurs de tolérance pour l'eau potable (non traitée, dans le réseau de distribution)

Germes aérobies mésophiles	<	300	UFC/ml	OHyg*
Escherichia coli	Non décelable dans 100 ml			OHyg*
Entérocoques	Non décelable dans 100 ml			OHyg*
Sporulées anaérobies (clostridies)	<	10	Spores/l	BPF fromage

\* Ordonnance du DFI sur l'hygiène du 23 novembre 2005 (Etat au 25 mai 2009)

9 Analyses recommandées selon l'OHyg (état 1.04.2008) et AQ Fromarte 2008

Analyse par année :	Staphylocoques à coagulase positive		E. coli		Salmonella		Listéria	
	Nb d'analyse	UFC/g	Nb d'analyse	UFC/g	Nb d'analyse	UFC	Nb d'analyse	UFC
<b>Pâte dure</b>								
au lait cru	2	<10'000	-	<10	1	n.n./25g	2	n.n.
	Caillé 48-50°C (sans P-L)				prêt à la consommation: Pâte du fromage		prêt à la consommation: surface	
<b>Pâte mi-dure</b>								
au lait cru	6	<10'000	6	<10'000	2	n.n./25g	6	n.n./25g
	à la sortie*		fromage avant bain de sel		prêt à la consommation: Pâte du fromage		prêt à la consommation: surface + pâte	
partiellement thermisé	4	<10'000	4	<1'000	2	n.n./25g	6	n.n./25g
	fromage avant bain de sel		fromage avant bain de sel		prêt à la consommation: Pâte du fromage		prêt à la consommation: surface + pâte	
entièrement thermisé	3	<1'000**	3	100	2	n.n./25g	6	n.n./25g
	fromage avant bain de sel		fromage avant bain de sel		prêt à la consommation: Pâte du fromage		prêt à la consommation: surface + pâte	
pasteurisé	2	<100	2	100	-	-	4	n.n.
	fromage avant bain de sel		fromage avant bain de sel				prêt à la consommation: pâte	
<b>Pâte molle</b>								
au lait cru	52	<10'000	52	<10'000	52	n.n./25g	52	n.n./25g
	fromage après bain de sel		fromage après bain de sel		5j avant la vente: surface + la pâte		5j avant la vente: surface + la pâte	
partiellement thermisé	52	<10'000	52	<1'000	52	n.n./25g	52	n.n./25g
	fromage après bain de sel		fromage après bain de sel		5j avant la vente: surface + la pâte		5j avant la vente: surface + la pâte	
entièrement thermisé	6	<1'000**	6	100	6	n.n./25g	6	n.n./25g
	fromage après bain de sel		à la vente		5j avant la vente: surface + la pâte		5j avant la vente: surface + la pâte	
pasteurisé	4	<100	4	100	-	-	4	n.n./25g
	fromage après bain de sel		à la vente				Date limite de consom.: surface et pâte	

	Critères obligatoires selon l'OHyg Annex 1 et 3
	Recommandation d'ALP (divergent de l'AQ Fromarte)

\* En cas d'une température de chauffage  $\geq 50^{\circ}\text{C}$  l'examen du caillé est recommandé (analogue aux fromages à pâte dure)

\*\* selon l'OHy, la valeur de tolérance est identique à un fromage au lait pasteurisé (<100 UFC/g)

**Informations importantes:**

Les fréquences d'examen sont valables dans le cas où le fabricant a effectué les 5 analyses et rempli les exigences de l'OHyg. Celles-ci stipulent que seul 2 des 5 analyses peuvent être supérieures à "m" et que toutes les analyses doivent être inférieures à "M". Si durant le monitoring la limite des germes recommandée est dépassée (>m), il y a lieu de prendre des mesures afin d'améliorer l'hygiène de production et la sélection des matières

premières. En outre, le nombre de contrôles doit être augmenté jusqu'à ce que les mesures correctrices prises atteignent leur objectif. Si un produit respecte les exigences microbiologiques, la fréquence des analyses peut être diminuée. Toutes les modifications de la fréquence d'examen doivent être justifiées et enregistrées dans le classeur qualité de Fromarte. Elles doivent pouvoir être présentées, en cas de demande, à l'organe de contrôle.





