



Les bactéries propioniques du lait cru et leur impact sur la qualité des fromages à pâte dure et mi-dure

Auteurs:

Ernst Jakob, Ruedi Amrein, Meral Turgay, Hans Winkler, Nicolas Fehér



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Département fédéral de l'économie,
de la formation et de la recherche DEFR
Agroscope

Impressum

Editeur :	Agroscope, www.agroscope.ch
Renseignements :	Ernst Jakob E-Mail: ernst.jakob@agroscope.admin.ch
Rédaction :	Müge Yildirim-Mutlu, Agroscope
Mise en page et impression :	Glasson Imprimeurs Editeurs SA Bulle, Suisse
Download :	www.agroscope.ch/transfer
Copyright	© Agroscope 2016
ISSN	2296-7222 (Print) 2296-7230 (Online)

Table des matières

1. Introduction	4
2. Les bactéries propioniques	5
2.1 Où se trouvent les bactéries propioniques?	5
2.2 Propriétés physiologiques des bactéries propioniques	6
2.3 Propriétés technologiques des bactéries propioniques	7
3. Des défauts de fromage provoqués par des bactéries propioniques	9
3.1 Emmental	9
3.2 Fromages à pâte mi-dure	10
3.3 Gruyère	10
3.4 Sbrinz	10
4. Du lait d'une qualité irréprochable	12
5. Contaminations par les bactéries propioniques en fromagerie	13
6. Détection analytique des bactéries propioniques	14
6.1 Dénombrement microbiologique sur milieu solide	14
6.2 Quantification par PCR (réaction en chaîne par polymérase)	14
6.3 Analyse d'échantillons de laits congelés	14
7. Résumé	15
8. Sources	15

1. Introduction

Les bactéries propioniques sont redoutées pour leur faculté à engendrer des défauts de qualité dans la plupart des fromages à pâte dure et mi-dure. Cela concerne surtout les fromages fabriqués sans pasteurisation préalable du lait. De nature résistante, ces bactéries s'adaptent facilement à leur environnement et parviennent ainsi à se développer dans le fromage. Par conséquent, même de faibles contaminations du lait peuvent générer des défauts dans le produit final. Ceux-ci se distinguent par des points bruns sur la pâte du fromage, des ouvertures indésirables telles que des trous, des lainures, des becs mais aussi par des défauts d'arômes. Dans la fabrication de fromages type Emmental, des cultures propioniques sont nécessaires pour le développement des ouvertures. Par contre, les propioniques «sauvages», issues du lait cru, peuvent quant à elles endommager le produit par une fermentation secondaire.

Dans ce document seront traités les propriétés physiologiques et technologiques des bactéries propioniques ainsi que les problèmes causés par ces germes dans diverses variétés de fromage. Ensuite, ce sont les méthodes actuelles de détection des bactéries propioniques et les mesures à adopter pour prévenir une éventuelle contamination qui seront présentées.

2. Les bactéries propioniques

On compte aujourd'hui 13 espèces de bactéries propioniques: 6 sont désignées comme «les laitières» ou «classiques», les 7 autres comme «les cutanées», comme par exemple les *Propionibacterium acnes*, agent causal de l'acné.

Les bactéries propioniques «laitières» comprennent les espèces suivantes (Thierry et al. 2011):

P. acidipropionici, *P. cyclohexanicum*, *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. microaerophilum*, et *P. thoenii*.

P. freudenreichii est parfois divisée en deux sous-espèces: *P. freudenreichii* subsp. *Freudenreichii*, qui ne fermente pas le lactose ou seulement très lentement et *P. freudenreichii* subsp. *Shermanii*, qui fermente le lactose. Une division aujourd'hui très controversée.

2.1 Où se trouvent les bactéries propioniques?

On trouve des bactéries propioniques dans la flore des ruminants, dans les fèces des veaux, des vaches et des porcs et également dans l'ensilage. Cependant, il semble que leur présence dans les sels des ruminants ou dans l'ensilage est faible: < 100 ufc/g. C'est la raison pour laquelle, lors d'un essai, des chercheurs italiens (Rossi et al., 2000), n'ont pas trouvé de bactéries propioniques sur 11 échantillons prélevés dans des ensilages et 12 prélevés dans des fèces. En revanche, lors de ce même essai, 60% des échantillons de lait, 90% des échantillons de fromage et 100% des échantillons de lactosérum acidifié contenaient des bactéries propioniques. Comme le montre le tableau 1, *P. freudenreichii* et *P. jensenii* sont les plus répandues.

Cacanno et ses collaborateurs (Cacanno et al. 1995) ont analysé 306 échantillons de lait de producteur destinés à la fabrication de Grana Padano. Certains résultats obtenus ont montré une faible présence de bactéries propioniques et d'autres résultats une plus forte présence jusqu'à 27'000 ufc/ml. Pas moins de 21% des échantillons contenaient plus de 500 ufc/ml. *P. freudenreichii* a été décelé dans 65% et *P. jensenii* dans 25% de 60 isolats. Des isolats d'échantillons analysés par Fessler en 1997, provenant de plaines et d'alpages fribourgeois, ont révélé des résultats semblables.

Agroscope a examiné le lait de cuve de fromageries d'Emmental, de Gruyère et de Sbrinz. Dans 82% des échantillons, des bactéries propioniques ont été détectées. Dans tous les échantillons testés positifs, *P. freudenreichii* était toujours présent et dominant. 26% des isolats contenaient également

P. jensenii et 5 isolats *P. thoenii* ou *P. acidipropionici*. Dans les échantillons des fromageries de Gruyère, *P. freudenreichii* était présent dans 77% des 151 isolats de bactéries propioniques.

L'analyse de la flore des bactéries propioniques sur 34 échantillons de Sbrinz montre également une prédominance de *P. freudenreichii*. Cette espèce a été détectée dans tous les fromages à hauteur d'un million d'ufc/g et d'avantage. Deux fromages uniquement (6%) contenaient d'autres espèces de bactéries propioniques mais un nombre relativement faible.

Dans les fromages à pâtes mi-dure au lait cru, la flore des bactéries propioniques semble être un peu plus diversifiée. Dans deux des échantillons, Agroscope a trouvé d'autres bactéries propioniques en quantité comparable à *P. freudenreichii*.

Tableau 1: Présence de diverses espèces de bactéries propioniques dans le lait et le fromage

	Lait (Cacano et al. 1995)	Lait (Fessler, 1997)*	Lait (Rossi et al. 2000)	Fromage (Rossi et al. 2000)
	N=306 (100% pos.)	N= 94 / 28 Isolate	N=52 (60% pos.)	N=20 (90% pos.)
<i>P. freudenreichii</i>	65%	62% / 55%	39%	69%
<i>P. jensenii</i>	25%	21% / 15%	54%	27%
<i>P. thoenii</i>	5%	2% / 30%	3%	4%
<i>P. acidipropionici</i>	5%	15% / 0%	5%	-

* Echantillons de lait récoltés en plaine et en alpage dans le canton de Fribourg

2.2 Propriétés physiologiques des bactéries propioniques

Les bactéries propioniques ont généralement des allégations nutritionnelles modestes ce qui explique leur nombre répandu dans l'environnement. Leur croissance est relativement lente. Dans des conditions idéales, le temps de génération minimale est de 5 à 6 heures. Exposées directement à l'air, leur croissance s'arrête. Malgré cela, elles survivent sans problème dans des conditions aérobies.

La majorité des bactéries propioniques «laitières» forment des pigments. C'est la raison pour laquelle les colonies sont de couleur crème, orange au rouge brunâtre. Leur pigmentation est responsable de la formation de tâches indésirables sur le fromage. Selon les expériences d'Agroscope, les colonies fortement colorées, que l'on retrouve sur le lactat agar, sont principalement dues à la pigmentation de *P. jensenii*.

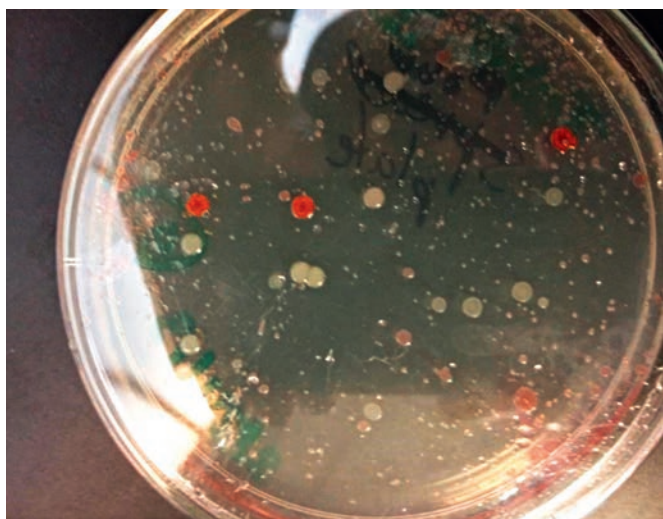


Photo 1: Boîte de Pétri contenant des colonies de bactéries propioniques et une flore d'accompagnement sur du lactate agar.

Les bactéries propioniques peuvent fermenter l'acide lactique, ce qui leur permet de se proliférer dans le fromage en cours d'affinage. A cet effet, ils peuvent utiliser trois voies métaboliques différentes.

(A) La fermentation du lactate classique



(B) La cofermentation du lactate et de l'acide aspartique



(C) La fixation du CO₂



La voie métabolique empruntée dépend du milieu nutritionnel et de la souche des bactéries. La voie métabolique de la cofermentation de l'acide lactique et de l'acide aspartique (B) joue un rôle majeur pour les souches avec une forte activité d'aspartase. Leurs enzymes scindent l'acide aspartique en ammoniac et en acide fumarique, ce dernier est ensuite transformé en acide succinique. Les bactéries propioniques avec une forte activité d'aspartase profitent de la protéolyse. L'ammoniac libéré augmente la valeur du pH des fromages, ce qui favorise la protéolyse. Dans l'Emmental, ce processus joue un rôle important lors de la fermentation secondaire. Comme on peut le constater sur la figure 2, l'activité de l'aspartase de *P. freudenreichii* dépend fortement de la souche.

Tableau 2: Propriétés des bactéries propioniques (Thierry et al., 2011; complété par d'autres sources).

Pigmentation	crème – rouge brun	forte pigmentation surtout par <i>P. jensenii</i> et <i>P. thoenii</i>
Température de croissance	optimum: 30 – 32°C	minimum: 4 – 6°C maximum: 37 – 45°C
Valeur pH	optimum: pH 6 – 7	minimum: pH 4,6 – 5,1
Temps de génération minimal	5 – 6 h (anaérobie)	
Besoin en oxygène	anaérobie jusqu'à faible aérotoleérant	pas de détérioration par le contact d'air
Substrats	acide lactique (lactate), galactose, glycérine, acide aspartique (aspartate)	
Produits issus du métabolisme	acide propionique (propionate), acide acétique (acétate), acide succinique (succinate), CO ₂	

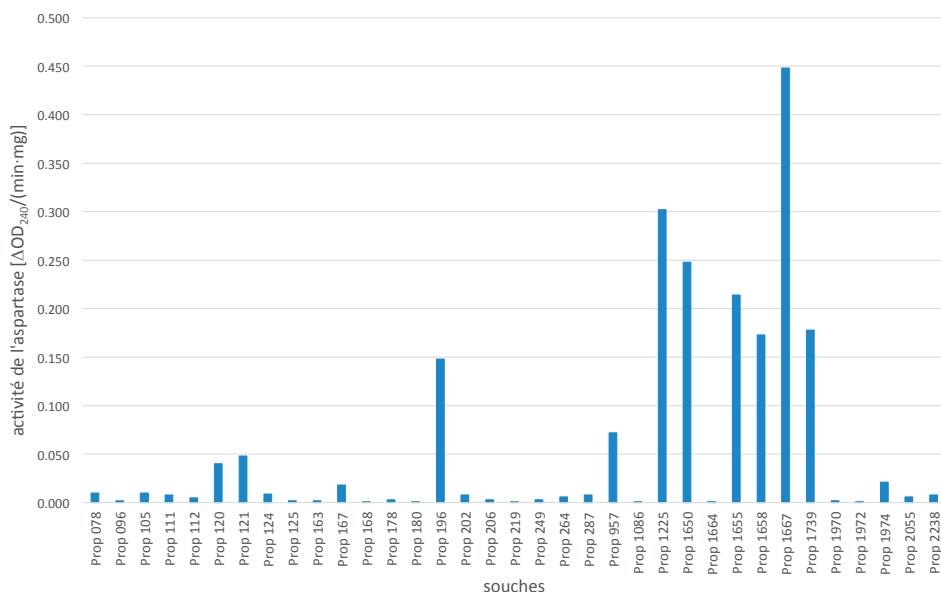


Figure 2: Activité de l'aspartase des différentes souches de *P. freudenreichii*, issue de la collection des souches d'Agroscope.

L'importance de la voie métabolique de fixation du CO₂ (C) est encore méconnue mais elle est généralement considérée comme moins significative.

2.3 Propriétés technologiques des bactéries propioniques

Température de croissance

Des essais d'Agroscope ont montré que les bactéries propioniques se développent bien dans un fromage, même à une température de 14°C (Fröhlich & Eugster 2005). En effet, des Emmental modèles sont parvenus à développer leurs ouvertures typiques à 14°C sans maturation préalable en cave chaude. Par contre, il leur a fallu 25 semaines à la place des 6 à 8 semaines habituelles. La plupart des bactéries propioniques terminent leur croissance à des températures situées entre 5 et 10°C.

Vitesse de croissance

Dans le fromage, lors de conditions favorables, la durée de génération des bactéries propioniques est de 10 à 35 heures. Le développement est plus rapide dans des conditions de laboratoire, mais reste toutefois assez lent. Une contrainte pour l'analyse du dénombrement sur milieu solide où, pour obtenir des colonies visibles, une incubation d'au moins 5 à 7 jours est nécessaire.

Résistance aux températures

Les bactéries propioniques sont assez résistantes aux températures élevées, spécialement pour *P. freudenreichii*. Pour de courtes durées d'exposition à la chaleur, elle commence à s'endommager à environ 58°C. La sensibilité dépend de la souche. Pour des espèces résistantes à la chaleur, un chambrage de 7 minutes à une température de 64°C est nécessaire pour inactiver 90% des germes (figure 3).

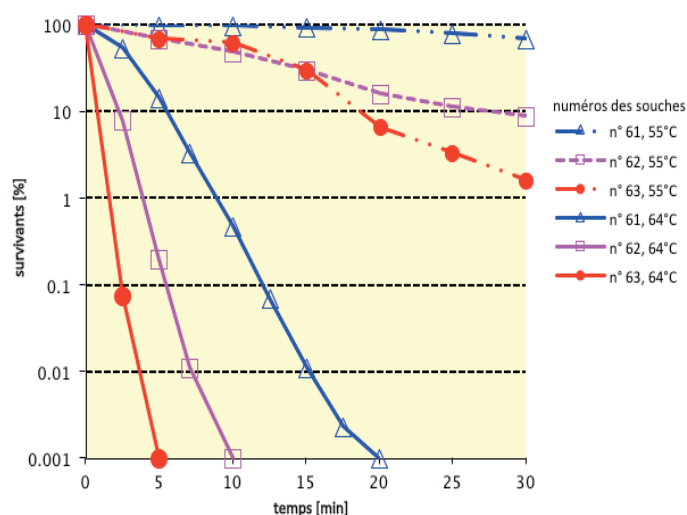


Figure 3: Sensibilité thermique de trois souches de bactéries propioniques à une température de 55°C et 64°C.

Le travail de Rossi et de ses collaborateurs (Rossi et al. 2000), montre que *P. jensenii*, *P. thoenii* et surtout *P. acidipropionici* sont moins résistantes à la chaleur que *P. freudenreichii*. C'est peut-être pour cette raison qu'on retrouve pratiquement que *P. freudenreichii* dans le fromage à pâte dure.

Sensibilité au sel

Une étude menée avec des fromages modèles type Emmental, salés dans un bain de sel à différentes durées, montre que les bactéries propioniques sont plutôt sensibles au sel (figure 4). Dans un essai en laboratoire, une concentration en sel de 5 g par litre provoque déjà un retard de croissance. Avec 50 g de sel, la croissance s'arrête presque complètement. Cela signifie théoriquement que, pour un fromage contenant entre 35 et 40% d'eau, une teneur en sel de 17 à 20 g/kg suffirait à inhiber la croissance des bactéries propioniques. C'est justement dans les jeunes fro-

mages, où le sel n'est pas réparti de manière homogène, que le risque d'une fermentation secondaire est le plus élevé. Nous avons également souvent observé des points bruns sous la croûte du fromage. Il existe donc des bactéries propioniques qui ont une tolérance au sel particulièrement élevée.

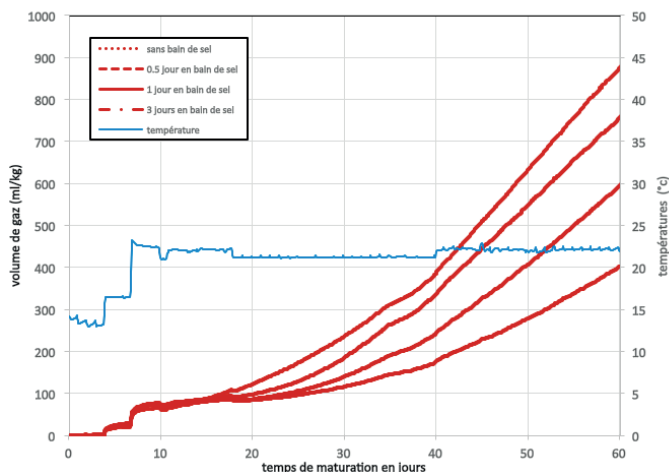


Figure 4: Formation de gaz dans un Emmental modèle avec des temps de saumurage différents.

En effet, il existe des cultures de bactéries propioniques avec une tolérance en sel élevée. Elles sont utilisées dans la fabrication du fromage norvégien Jarlsberg.

Sensibilité au cuivre

Les propriétés antimicrobiennes du cuivre sont bien connues. Elles sont probablement dues au fait que le cuivre se lie à certains enzymes et les inactive par une perturbation du métabolisme cellulaire.

Le cuivre catalyse également la formation de composés d'oxygène hautement réactifs qui engendrent des dommages cellulaires. Des fromages fabriqués dans des cuves en cuivre contiennent normalement 3 à 12 mg/kg de cuivre. Des teneurs en cuivre à partir de 25 à 30 mg/kg sont susceptibles de provoquer des colorations vertes particulièrement visibles sous croûte.

Dans une enquête réalisée sur le terrain, Agroscope n'a pas pu détecter de différences de qualité entre les lots contenant une faible teneur en cuivre (valeur moyenne de 2,6 mg/kg) et les lots contenant une teneur en cuivre normale (valeur moyenne de 6,9 mg/kg). Lors d'une étude réalisée sur des Sbrinz, seuls les fromages d'une teneur en cuivre au-dessus de 9 mg/kg ont montré une tendance à réduire la croissance de bactéries propioniques.

3. Des défauts de fromage provoqués par des bactéries propioniques

3.1 Emmental

Il y a environ 20 ans que les problèmes de fermentation secondaire dans l'Emmental ont pu être diminués par l'introduction de cultures hétérofermentaires facultatives (*Lb. casei* et *Lb. rhamnosus*) et une amélioration des cultures de bactéries propioniques. Aujourd'hui, cette problématique est à nouveau d'actualité. La statistique sur les taxations (figure 5) ne permet pas de visualiser les fermentations secondaires suspectées à tort ainsi que les fermentations secondaires qui ont lieu après la taxation.

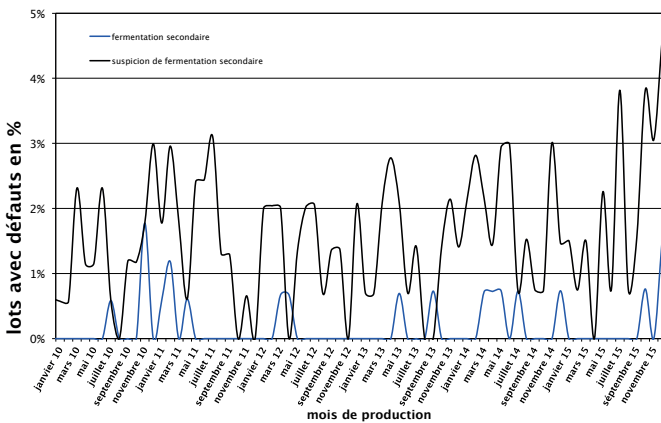


Figure 5: Lots d'Emmental AOP taxés avec suspicion de fermentation secondaire. Lots taxés entre janvier et décembre 2015.

Des bactéries propioniques sauvages peuvent poser des problèmes dans l'Emmental

Une étude de microbiologie moléculaire menée en 2008 sur la flore des bactéries propioniques d'un Emmental de la fromagerie d'Uttligen a obtenu des résultats étonnants (Turgay et al., 2011). Après 6 mois de maturation des fromages, ce n'était plus la souche de bactéries propioniques issue de la culture Prop 96 qui dominait le milieu, mais des bactéries propioniques sauvages provenant du lait cru. Des changements ont également été observés dans des fromages fabriqués avec la culture Prop 01. Par contre, ce sont ici les deux souches de bactéries propioniques à forte activité d'aspartase provenant de la culture qui commençaient à dominer (figure 6). On peut conclure que des souches sauvages de bactéries propioniques à forte activité d'aspartase peuvent détruire les propriétés de la Prop 96. Celle-ci à normalement la faculté d'influencer la fermentation secondaire de telle manière à ce qu'elle reste faible. Autrement dit, dans la fabrication d'Emmental, il est également important de veiller à ce que le lait cru ne soit pas contaminé par des bactéries propioniques.

Il faut maîtriser la protéolyse

Comme cela a déjà été évoqué, une forte protéolyse favorise la croissance des bactéries propioniques à forte activité d'aspartase. Par conséquent, il est également important que le lait ne soit pas contaminé par des lactobacilles très protéolytiques et surtout pas par *Lb. Helveticus*. On pourrait imaginer des contaminations croisées à travers

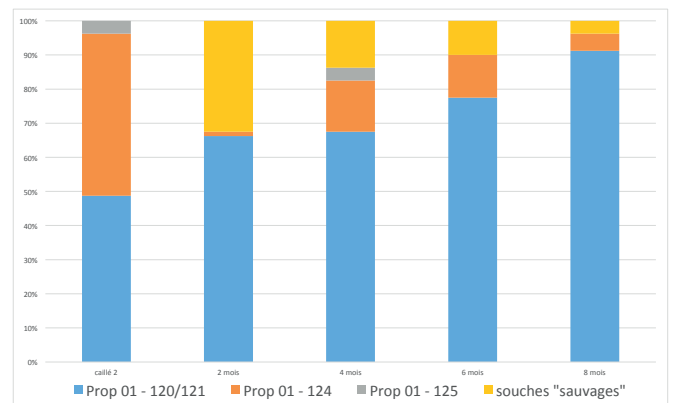
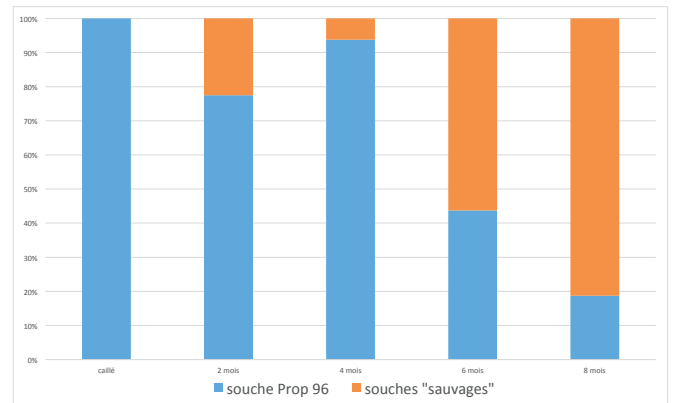


Figure 6: Modification de la composition de la flore des bactéries propioniques dans l'Emmental pendant la maturation. Le 1^{er} graphique montre des fromages contenant la Prop 96 et le 2^e celui de la Prop 01.

des cultures contenant du *Lb. Helveticus* utilisées pour la fabrication de spécialités.

Lors de soupçon d'une protéolyse trop intense, par exemple par une fermentation secondaire ou une pâte blanche sur les bords, Agroscope recommande depuis plusieurs années d'analyser la teneur en acides aminés libres par la valeur-opa, d'un échantillon prélevé à 3–12 mm du bord du fromage de 20 jours. Le résultat ne devrait pas dépasser la valeur de 45 mmol/kg.



Figure 7: Emmental montrant des signes de fermentations secondaires, laines dans les zones du bord et ouvertures ovales.

3.2 Fromages à pâte mi-dure

Les fromages à pâte mi-dure à croûte lavée fournissent, à travers de la teneur en eau et de la désacidification relativement rapide de la pâte, de bonnes conditions de croissance aux bactéries propioniques. Cependant, le cuivre, le sel et des températures en dessous de 15°C leur sont défavorables.

Grâce à une thermisation du lait adaptée (température et durée), la teneur en bactéries propioniques peut être diminuée en dessous du seuil de détection de 10 ufc/ml. Comme *P. freudenreichii* est relativement résistant à la chaleur, la température de thermisation joue un rôle déterminant. Une thermisation à 65°C pendant 15 secondes a le même effet sur les germes végétatifs qu'une thermisation à 60°C pendant 5 minutes. Si une fermentation propionique a lieu dans des fromages au lait pasteurisé, il s'agit d'une recontamination du produit par des bactéries propioniques au cours de la fabrication. Après le pressage des fromages, les bactéries propioniques ne parviennent plus à pénétrer dans le fromage.

La croissance de bactéries propioniques dans les fromages à pâte mi-dure peut provoquer essentiellement deux défauts typiques: premièrement, le fromage peut présenter de grandes ouvertures en forme de trous, lainures et becs (figure 8), souvent accompagnées d'une saveur douceâtre.



Figure 8: Fromage Appenzeller de 3 mois avec de trop grandes ouvertures, des lainures et des becs

Deuxièmement, le fromage peut présenter des points visibles sur la pâte. Ils sont souvent situés sous la croûte. La cause exacte de l'apparition des points n'est pas connue. Sur les bords du fromage, les bactéries propioniques profitent d'une part de la désacidification plus rapide provoquée par la morge et, d'autre part, elles sont davantage inhibées par une teneur en sel plus élevée. Il est possible que certains facteurs liés au stress les amènent à développer des colonies plus pigmentées.



Figure 9: Fromage à pâte mi-dure avec des points bruns sous croûte

3.3 Gruyère

Les fermentations propioniques sont moins fréquentes dans le Gruyère que dans d'autres fromages. Cependant, dans les années 90, elles étaient la cause principale d'une conservation insuffisante. Cela est souvent en lien avec une teneur en sel trop basse, inférieure à 12 g/kg. Aujourd'hui, la conservation des Gruyère est nettement améliorée.

La température de chauffage du grain de fromage est sans aucun doute la raison principale pour laquelle les fermentations propioniques sont aujourd'hui moins fréquentes. Le stockage du lait dans la cuve en cuivre et la diffusion rapide du sel vers l'intérieur de la pâte du fromage freinent également le développement des bactéries propioniques. Par ce biais, elles sont inhibées de sorte que leurs défauts produits dans le fromage passent en général inaperçus. De plus, la plupart des fromageries de Gruyère font examiner des échantillons de lait de leurs fournisseurs afin de détecter une éventuelle présence de bactéries propioniques. L'analyse se fait mensuellement avec une exigence de <20 ufc/ml. Malgré tout, des défauts de fromage engendrés par les bactéries propioniques existent. Ils se manifestent souvent par des lainures (figure 10) et/ou par des points bruns dans la pâte ou souvent sous la croûte.



Figure 10: Gruyère de 6 mois avec des lainures et une teneur en acide propionique de 7,2 mmoll/kg

3.4 Sbrinz

Les bactéries propioniques sont les germes étrangers qui engendrent le plus souvent des défauts dans la fabrication du Sbrinz et sont ainsi responsables de pertes financières

importantes. Ces défauts sont perçus généralement de manière sensorielle entre 5 et 11 mois d'affinage. Des petits points bruns sur la pâte apparaissent (figure 11) et les fromages développent un goût douceux. Contrairement aux fromages à pâte mi-dure et dure à croûte lavée, les points bruns se trouvent plutôt vers le milieu de la pâte. Le long passage dans le bain de sel pendant 15 à 20 jours explique ce phénomène. Parfois, la fermentation propionique est si forte qu'elle peut engendrer des lainures verticales ou des becs. Des Sbrinz présentant un défaut sensoriel lors du contrôle de qualité à l'âge de 11 mois sont systématiquement analysés par une chromatographie afin de contrôler la présence de bactéries propioniques. Les fromages contenant plus de 2 mmol/kg d'acide propionique ne sont pas affinés plus longtemps mais sont alors utilisés pour la fonte.



Figure 11: Sbrinz avec des points bruns

Flore propionique du lait et du fromage des fromageries de Sbrinz

Dans une récente étude menée par Agroscope sur la présence de bactéries propioniques dans le Sbrinz, 40 fromages âgés de 11 mois ont été analysés au niveau du pH, du cuivre et de la teneur en sel. Les résultats sont résumés dans la figure 12. Des fromages dont le nombre de bactéries propioniques se situe en dessous de 1 million par gramme, contiennent en général moins de 2 mmol/kg d'acide propionique. Ces fromages étaient de bonne qualité. Cependant, 4 fromages, présentaient un nombre élevé de bactéries propioniques et une teneur importante en acide propionique. Pourtant, elles n'ont pas été décelées dans le lait de cuve. L'enquête a également montré que le nombre de bactéries propioniques trouvées dans le Sbrinz ne correspond pas au nombre de bactéries propioniques trouvées dans le lait de cuve. Cela s'explique par le fait que les bactéries propioniques présentent des sensibilités différentes à la chaleur. Dans le fromage, elles se développent également à des vitesses différentes. La bio-

diversité de *P. freudenreichii* dans le lait à une influence considérable sur le potentiel de développement de ces germes dans le fromage.

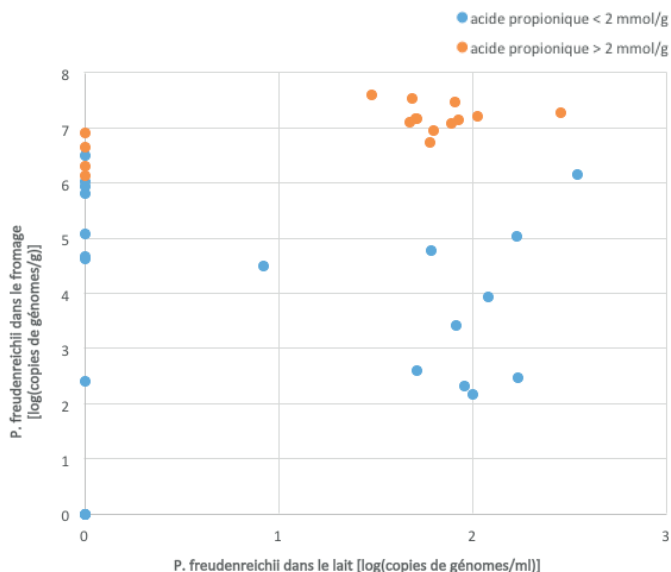


Figure 12: Relation entre le nombre de *P. freudenreichii* dans le lait de cuve et dans les Sbrinz de 11 mois / teneur en acide propionique des fromages / quantification de *P. freudenreichii* effectuée par la méthode PCR quantitative / résultat correspondant au nombre de copies de génomes par ml ou g.

Des contaminations par des bactéries propioniques peuvent également se produire en fromagerie. Introduites par le lait cru, ces bactéries peuvent s'incruster dans les installations, surtout lors d'un nettoyage insuffisant. Une attention particulière doit être accordée aux systèmes de soutirage.

Tableau 3: Résultats d'analyse d'une fromagerie où des Sbrinz ont subi une fermentation secondaire, malgré un lait de cuve irréprochable.

Point d'échantillonnage	qPCR <i>P. freudenreichii</i>	qPCR autres bactéries propionique
Raccords cannes de soutirage (frotti)	positive	-
Sous presse, à l'extrémité droite (frotti)	positive	positive
Sous presse, à l'extrémité gauche (frotti)	positive	positive
Petit-lait à l'arrivée sur la presse	positive	négative

Influence de différents composants sur la maturation du Sbrinz

Dans l'étude présentée précédemment, le pH et la teneur en sel des fromages ne montrent pas d'influence significative sur la croissance des bactéries propioniques et sur l'acide propionique des fromages. Ceci n'est pas surprenant car les variations du pH et de la teneur en sel étaient plutôt modestes. Les fromages comportant une teneur en cuivre supérieure à 9 mg/kg présentent tendanciellement de meilleures aptitudes d'affinage.

4. Du lait d'une qualité irréprochable

Il existe de nombreuses sources de contamination du lait par des bactéries propioniques. Mais elles contaminent le lait uniquement pendant la traite. L'installation et l'hygiène de traite en sont les sources principales. Cependant, l'environnement des vaches joue également un rôle important. Un environnement chargé par des bactéries propioniques fournit de nombreuses sources de contamination.

Les zones particulièrement critiques

Les bactéries propioniques aiment se multiplier dans des matières organiques et sous conditions anaérobies, en particulier dans les endroits suivants:

Étable: litières souillées, tapis en caoutchouc en mauvais état, zones humides autour des abreuvoirs, etc.

Zone d'affouragement: mélangeuse, restes d'affouragement, stations d'affouragement, etc.

L'installation de traite est la source de contamination principale

Garder l'installation de traite exempte de bactéries propioniques et d'autres microorganismes exige l'observation stricte des points suivants:

- Un montage impeccable de l'installation
 - Une maintenance et un entretien effectués de manière professionnelle
- Les pièces de l'installation doivent être contrôlées et, si nécessaire, nettoyées ou remplacées lors du service d'entretien annuel:

- Conduite à vacuum, -tank, -vanne
- Régulateur du vacuum
- Raccords, joints de la conduite à lait
- Toutes les pièces d'usure
- Compteur à lait
- Température de la solution de nettoyage
- Quantité de la solution de nettoyage (le volume est-il suffisant?)
- Propreté des endroits critiques, tels que les raccords, les joints, etc.

Il faut également informer les producteurs de lait sur la fréquence de nettoyage des griffes, des robinets de lait, des joints de l'unité terminale, etc.

- Nettoyage de l'installation de traite
 - Rincer l'installation immédiatement après chaque traite, nettoyer puis rincer à nouveau
 - Appliquer un nettoyage alcalin et acide en alternance
 - Vérifier si le dosage des produits de nettoyage est conforme aux prescriptions du fabricant
 - Contrôler si la solution de nettoyage atteint au moins 60°C

Instructions pour élever la température: pré-rincer à l'eau chaude, augmenter la température du boiler ou la quantité de solution de nettoyage, installer un chauffe-eau ou veiller à le régler correctement. Il faut se rappeler que, lors d'une baisse de tempé-

ture de 5°C, le temps du traitement thermique doit être multiplié par 20 pour éliminer le même nombre de bactéries.

Les ustensiles doivent être nettoyés régulièrement à la main:

- › Couvercle et joint de l'unité terminale
- › Robinet à trois voies
- › Robinet de lait
- › Griffe
- › Sortie du tank
- › Joint du brasseur du tank



Figure 13: Des points faibles en matière d'hygiène découverts lors de visites d'étables. L'image de gauche montre une griffe avec du lait caillé à l'intérieur. À droite, un robinet à trois voies avec des résidus de lait.

Facteurs liés à l'installation de traite

- L'utilisation d'une éponge servant à pousser le reste du lait hors des conduites peut être responsable de contaminations microbiologiques. Il est donc évident que le lait «épongé» ne doit pas être livré à la fromagerie. Il peut par contre être utilisé pour les veaux.
- Le système de traite doit être conçu pour que l'eau résiduelle à l'intérieur des conduites puisse s'écouler toute seule. Il ne doit pas être nécessaire d'utiliser une éponge.
- Les expériences des conseillers de traite ont montrées que les infections des laits de producteur par des bactéries propioniques sont toujours issues de contamination des installations de traite ou du tank à lait. Ébouillanter une installation de traite contaminée à l'aide de vapeur d'eau est un bon moyen pour lutter contre les bactéries propioniques. Selon les expériences d'Agroscope, les laits obtiennent par la suite de bons résultats pendant plusieurs mois. Cependant, les sources de contamination doivent être éliminées avant l'intervention.

5. Contaminations par les bactéries propioniques en fromagerie

Agroscope a pu observer, aux travers de nombreuses enquêtes en fromagerie et sur plusieurs années, qu'en règle générale les bactéries propioniques parviennent dans la fromagerie par le biais de lait contaminé. Elles se développent par la suite dans les installations à cause d'entretiens, de nettoyages ou de désinfections insuffisantes. La priorité lors de l'assainissement d'une fromagerie réside donc dans l'élimination de lait de producteur contaminé par des bactéries propioniques. Cette action est nécessaire afin d'éviter de nouvelles contaminations du système de soutirage et de la presse.

Les contrôles par étapes peuvent fournir de précieuses informations sur le chemin emprunté par les bactéries propioniques pour arriver en fromagerie. Le problème des bactéries propioniques est qu'une faible quantité suffit pour causer des dommages importants. Il n'est donc pas toujours évident de déceler les faibles contaminations dont le niveau se trouvent en dessous du seuil de détection des méthodes d'analyse usuelles.

Afin d'identifier les sources de contaminations, un contrôle d'hygiène optique est fortement recommandé. Les sources de contaminations sont ensuite confirmées par frottis (tableau 3). Pour ce faire, les raccords des tuyauteries et les vannes doivent être démontés.

Sources de contaminations potentielles des bactéries propioniques:

- la sortie du tank du lait de report
- les cannes de distribution du grain
- les raccords dévissés ou pas assez serrés
- l'eau résiduelle dans le système de soutirage
- les vérins de la presse et la vanne de petit-lait

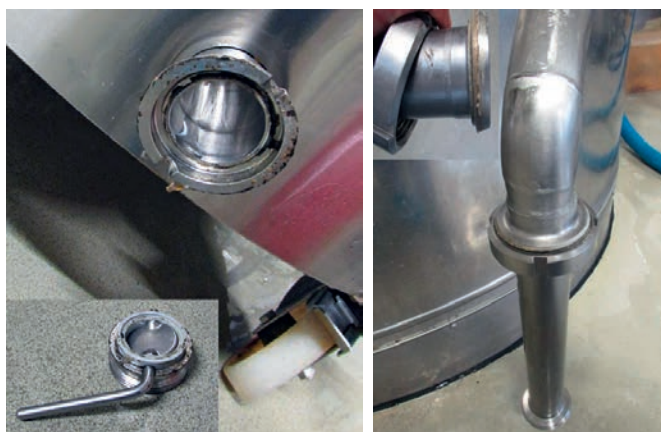


Figure 14: Lacunes au niveau de l'hygiène décelées lors d'une visite en fromagerie. À gauche, la sortie d'un tank à lait avec des résidus sur le raccord de la vanne. À droite, un raccord du système de soutirage avec des résidus.

Comment éviter les contaminations?

- Inspection quotidienne de la propreté des installations
- Surveillance quotidienne des paramètres du CIP, comme la température, la concentration, etc.
- Remplacement régulier des pièces d'usure tels que joints, tuyaux-souple, pale en caoutchouc
- Élimination immédiate des fuites
- Nettoyage et désinfection quotidien du système de soutirage
- Entretien professionnel annuel
- En cas de suspicion d'infection: rincer la conduite à l'eau propre et échantillonner les premiers jets sortant de l'installation. Effectuer une analyse microbiologique sur les échantillons récoltés. Des résultats immédiats fournissent par exemple la mesure de l'ATP (contacter les services de conseils régionaux).

6. Détection analytique des bactéries propioniques

6.1 Dénombrement microbiologique sur milieu solide

Les laboratoires de l'industrie laitière utilisent un lactate agar pour le dénombrement de colonies de bactéries propioniques du lait cru. Ce dernier est composé de 30 g de peptone de caséine et de peptone de levure, de 15 g de lactate de sodium et de 12 g d'agar-agar pour l'élaboration d'un litre de milieu nutritif. Le lait est ensemencé en surface dans des boîtes de Petri et le tout est incubé à 30°C pendant 9 à 10 jours et sous conditions anaérobies. Les colonies colorées de beige et brun sont ensuite comptées. La couleur de la colonie ne permet pas une différenciation sûre entre les diverses espèces de bactéries propioniques. La flore, qui se développe en parallèle sur le milieu nutritif, peut fausser le comptage. De plus, la distinction entre les colonies de bactéries propioniques et les autres colonies peut porter à confusion. Lors d'une étude comparative de plusieurs laboratoires effectuée en 2014, cinq différents échantillons de lait cru ont été analysés. L'étude a révélé que la variabilité des résultats dépend de l'échantillon. C'est-à-dire que, pour un échantillon d'une teneur moyenne en germes de 100 ufc/ml, la dispersion des résultats était comprise entre 50 et 200 ufc/g.

6.2 Quantification par PCR (réaction en chaîne par polymérase)

En raison de la durée de l'analyse par dénombrement microbiologique et des résultats parfois contradictoires, la filière laitière a exprimé le souhait d'obtenir une analyse plus réactive et plus précise. Pour répondre à ce besoin, Agroscope a développé des méthodes PCR permettant une détection spécifique des espèces de bactéries propioniques les plus importantes ainsi qu'une quantification avec une limite de détection plus basse.

La méthode permet de détecter les espèces suivantes:

- *P. freudenreichii*
- *P. thoenii*
- *P. jensenii*
- *P. acidipropionici*

Jusqu'à présent, il n'est toujours pas possible de développer une méthode qPCR (quantification par PCR) pour une détection simultanée des quatre espèces dites les plus importantes. Ces dernières ne montrent pas assez de similitudes entre elles pour pouvoir les distinguer des autres genres de bactéries.

Comparés aux résultats obtenus avec le dénombrement sur milieu solide, les résultats de la méthode qPCR pour *P. freudenreichii* sont comparables à partir d'une teneur en germes de 10 à 50 ufc/ml, malgré que les deux méthodes se différencient au niveau de la sélectivité. La figure 12 l'illustre.

La limite inférieure de détection de la méthode qPCR se trouve à 50 unités de génome par litre de lait. Ces unités correspondent théoriquement au nombre de cellules vivantes et mortes. Des valeurs inférieures à cette limite ne sont pas fiables. En effet, dans ce cas, la flore d'accompagnement peut interférer lors du comptage et rendre le dénombrement des bactéries propioniques plus difficile. Il est important d'être attentif au fait que la méthode qPCR comptabilise aussi des colonies qui ne se reproduisent pas. Ce qui n'est pas le cas pour le dénombrement sur milieu solide.

Agroscope est persuadé que la méthode qPCR est un outil sûr permettant une détection sélective des bactéries propioniques les plus importantes du lait cru, comme par exemple *P. freudenreichii*.

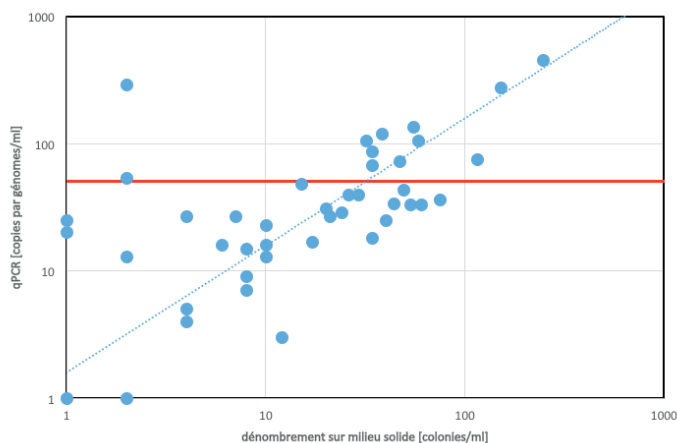


Figure 15: Comparaison de la méthode du dénombrement sur milieu solide et de la méthode qPCR par des échantillons de lait de cuve de fromageries fabriquant des pâtes dures. La ligne rouge illustre, avec 50 unités de génome par millilitre de lait, la limite de dénombrement inférieure de la méthode qPCR. Pour le comptage des colonies, 0,5 ml de lait ont été réparti sur 5 plaques. Trois résultats avec <2 ufc/ml ont été considérés comme 1 ufc/ml.

6.3 Analyse d'échantillons de laits congelés

Des essais ont montré que la congélation et la décongélation des cultures liquides de Liebefeld dans un congélateur standard font perdre la capacité de reproduction de 90% des bactéries propioniques. En revanche, les bactéries propioniques semblent très bien survivre à la congélation et à la décongélation du lait.

Lors de l'étude comparative interlaboratoires effectuée en 2014, aucune diminution du nombre de colonies n'a été observée avec la méthode du dénombrement sur milieu solide. Cela, même lorsque les échantillons ont été congelés pendant plus de 6 mois.

7. Résumé

Les bactéries propioniques peuvent causer des dommages dans tous les fromages à pâte dure et mi-dure, même dans l'Emmental. Les défauts les plus courants sont des fermentations secondaires se manifestant au travers d'ouvertures atypiques comme par exemple des lainures, mais également un goût doucereux ou encore l'apparition de points bruns indésirables sur la pâte.

P. freudenreichii est certainement la bactérie propionique qui engendre le plus de défauts. Elle est plutôt résistante à la chaleur et survit à la température de chauffage du grain dans la fabrication du Sbrinz ou à une thermisation de 65°C sans chambrage. *P. freudenreichii* est capable de se multiplier pendant la maturation du fromage. De plus, elle peut déjà engendrer des défauts quand elle se trouve en nombre qui est à la limite de détection de la méthode d'analyse par comptage sur milieu sélectif. Il est d'autant plus important d'analyser régulièrement le lait des producteurs et d'intervenir rapidement si cela est nécessaire. Ainsi, c'est la seule manière de pouvoir éviter les contaminations du lait de cuve et d'empêcher les dommages, ceci surtout lors de fabrications de fromages au lait cru.

8. Sources

- Cacano M., Todesco R., Lodi R. & Brasca M. 1995. Propionibacteria in Italian hard cheeses. *Le Lait*, 75 (4-5), 415-426
- De Freitas R. und Mitarbeiter. 2015. New insights about phenotypic heterogeneity within *Propionibacterium freudenreichii* argue against its division into subspecies. *Dairy Science & Technology*, 95, 465-477
- Fessler D., 1997. Characterisation of propionibacteria in Swiss raw milk by biochemical and molecular-biological methods. Dissertation ETH Zürich Nr. 12328
- Fröhlich-Wyder M.T. & Bachmann H.P. 2004. Cheeses with Propionic Acid Fermentation. In: Fox F.P., McSweeney P.L.H., Cogan T.M. & Guinee T.P. (Hrsg). *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Third edition – Volume 2: Major Cheese Groups. Elsevier, ISBN 0-1226-3653-8
- Fröhlich-Wyder, M.-T., Eugster-Meier, E. (2005). Kann Grosslochkäse ohne Gärraumauenthalt hergestellt werden? *Agrarforschung*, 12 (9), 410-415.
- Hofherr L.A. Hammond E.G., Glatz B.A., Ross P.F. 1983. Relation of Growth Temperature to Fatty Acid Composition of Propionibacterium Strains. *Journal of Dairy Science*, 66 (8), 1622-1629
- Rossi F., Dellaglio F., Peluso M. & Torriani S. 2000. Propionibatteri caseari: diffusione, resistenza agli stress tecnologici e proprietà antagonistiche. *Industrie Alimentari*, XXXIX, 553-557.
- Piveteau P. 1999. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Le Lait*, 79, 23-41
- Thierry A., Falentin H., Deutsch S. M. & Jan G. 2011. Propionibacterium spp. In: Fuquay J.W., Fox P.F. & McSweeney P.L.H. (Hrsg.). *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd Edition. Academic Press, ISBN-9780123744074
- Turgay M., Irmiler S., Isolini D., Amrein R., Fröhlich-Wyder M.-T. Berthoud H., Wagner E., Wechsler D., 2011. Biodiversity, dynamics, and characteristics of *Propionibacterium freudenreichii* in Swiss Emmentaler PDO cheese *Dairy Science & Technology*, 91 (4), 471-489
- Turgay M., Schaeren W., Wechsler D., Bütikofer U., Graber H.U. 2016. Fast detection and quantification of propionibacteria in milk samples using real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). *International Dairy Journal*, 61, 37-43

