

Éviter les contaminations persistantes dans les installations de traite

Jürg Maurer, Daniel Wechsler, Stefan Irmeler et Thomas Berger

Agroscope, 3003 Berne, Suisse

Renseignements: Jürg Maurer, e-mail: juerg.maurer@agroscope.admin.ch



Même des installations de traite très bien entretenues et propres visuellement peuvent être contaminées de manière persistante par des bactéries propioniques et *L. parabuchneri*. (Photo: Jürg Maurer, Agroscope)

Introduction

Les bactéries propioniques et *Lactobacillus parabuchneri* (*L. parabuchneri*) causent de façon répétée de graves défauts dans le fromage; *L. parabuchneri* peut même entraîner des problèmes de santé. La valeur commerciale des produits en est fortement réduite. Ces microorganismes pénètrent généralement dans le processus de transformation par le lait contaminé des fournisseurs et, en raison de leur résistance à la chaleur, ne sont pas supprimés lors de la fabrication de fromages à pâte mi-dure et de certains fromages à pâte dure à base de lait cru. Ces deux microorganismes peuvent se multiplier dans le fromage affiné, entraîner une formation excessive de CO₂, des défauts d'arôme et, dans le cas de *L. parabuchneri*, la formation d'amines biogènes, en particulier d'histamine, nocives à la santé. Les fromages contaminés présentent souvent une ouverture atypique ou même des lainures dans la pâte (fig. 1 et 2).

Les bactéries propioniques forment de l'acide propionique à partir de l'acide lactique, ce qui confère au fromage un arôme sucré. L'espèce *Propionibacterium freudenreichii* est la plus connue parmi les bactéries propioniques. Elle est ajoutée lors de la production de l'Emmentaler pour favoriser l'ouverture et l'arôme. Dans d'autres sortes de fromage comme l'Appenzeller, le fromage à raclette ou le Gruyère, la formation d'acide propionique est absolument indésirable, car la croissance des bactéries propioniques dans le fromage donne à celui-ci un arôme atypique et provoque souvent une ouverture atypique elle aussi ou des taches brunes.

L. parabuchneri est connu pour la formation d'histamine, qui est un produit de dégradation de l'acide aminé histidine. Les fromages fortement contaminés par l'histamine sont perçus en bouche comme piquants et brûlants, car l'histamine irrite les muqueuses buccales. De nombreux consommateurs-trices trouvent ces fromages désagréables et les évitent. Dans environ 1 % de la population, la consommation d'aliments contenant de l'histamine entraîne même des réactions pseudo-allergiques avec des symptômes tels que diarrhée, maux de tête, rougeurs cutanées et nausées.

Afin d'éviter les contaminations par des bactéries propioniques et par *L. parabuchneri* dans les installations de traite et donc du lait, Agroscope Liebefeld a développé des méthodes fiables et rapides pour détecter ces germes indésirables. Ces méthodes facilitent l'identification des sources de contamination dans les exploitations laitières touchées et l'élaboration de recommandations pour éviter une contamination persistante.

Présence et détection des bactéries propioniques

Les bactéries propioniques se trouvent dans la flore de la panse des ruminants et dans leurs fèces ainsi que dans les ensilages. Les microorganismes pénètrent depuis l'environnement de l'étable dans les installations de traite, où ils peuvent, si les conditions sont favorables, se nicher et persister. On trouve généralement quatre espèces de bactéries propioniques dans le lait et les produits

laitiers. Il s'agit de *Propionibacterium freudenreichii*, *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium jensenii* et *Propionibacterium acidipropionici*. Parmi ces quatre espèces, *Propionibacterium freudenreichii* est celle qui résiste le mieux à la chaleur, c'est pourquoi cette espèce est particulièrement redoutée. Dans les sortes de fromage fabriqués à haute température, comme le Sbrinz et le Gruyère, où lors de leur fabrication le caillé est chauffé à des températures situées entre 56 et 57 °C pendant plusieurs minutes, les fermentations propioniques indésirables sont provoquées exclusivement par *Propionibacterium freudenreichii* (Turgay *et al.* 2018). La détection classique des bactéries propioniques s'effectue sur des plaques d'agar et dure environ sept à dix jours. En Suisse, les laboratoires de l'industrie laitière utilisent pour l'analyse du lait cru un agar au lactate composé de 30 g de peptone de caséine et de peptone de levure, 15 g de lactate de sodium et 12 g d'agar par litre de milieu de culture. Les plaques inoculées sont incubées en conditions anaérobies à 30 °C pendant sept à dix jours. Les colonies typiques (en relief, beiges à rougeâtres) sont ensuite comptées. La couleur de la colonie ne permet pas une différenciation fiable des espèces de bactéries propioniques mentionnées ci-dessus. Ces dernières années, de nouvelles méthodes issues de la biologie moléculaire et basées sur la PCR quantitative (qPCR) ont été développées (Turgay *et al.* 2016); elles permettent une détermination plus rapide en un à deux jours. L'avantage de ces méthodes est que les



Figure 1 | Fromage à raclette avec un défaut d'ouverture causé par une fermentation propionique (teneur en acide propionique 38 mmol/kg).



Figure 2 | Emmentaler déclassé présentant des lainures et une sensation de brûlure en bouche, conséquence de la formation d'histamine par *L. parabuchneri* (teneur en histamine 485 mg/kg).

Résumé ■ Les contaminations persistantes par des bactéries propioniques et *Lactobacillus parabuchneri* dans les installations de traite entraînent des pertes financières répétées dans la transformation du fromage. L'histamine dans le fromage, causée par *Lactobacillus parabuchneri*, peut en outre affecter la santé des consommateurs-trices. Des méthodes biochimiques et de biologie moléculaire ont été développées et introduites dans la pratique afin de détecter ces germes rapidement et de manière fiable, tant dans le lait des fournisseurs que dans les installations de traite et les citernes à lait. Grâce à des enquêtes menées dans les exploitations de production laitière et au prélèvement d'échantillons sur différentes parties des installations de traite, les zones sensibles ont pu être identifiées et les causes les plus fréquentes de contaminations persistantes éliminées. Ainsi, des ressources et des informations sont désormais disponibles pour aider les exploitations laitières rapidement et de façon durable.

quatre types de bactéries propioniques présentes dans le lait cru peuvent être détectés de manière spécifique et quantitative. En outre, une méthode de détection basée sur la qPCR a été mise au point avec laquelle les trois espèces *Propionibacterium thoenii*, *Propionibacterium jensenii* et *Propionibacterium acidipropionici* peuvent être détectées simultanément. Ainsi, conjointement à la détection spécifique de *Propionibacterium freudenreichii*, il est possible de faire la distinction entre les bactéries propioniques résistantes à la chaleur et celles qui le sont moins.

Comme le montre la figure 3, la corrélation de la méthode qPCR pour *Propionibacterium freudenreichii* avec la méthode de dénombrement des colonies est relativement bonne à partir d'un nombre de bactéries de 10 à 50 ufc/ml, bien que les deux méthodes diffèrent au niveau de la sélectivité. La limite inférieure de détermination de la méthode qPCR est de 50 équivalents génome (EG; théoriquement équivalent au nombre de cellules vivantes et mortes) par ml de lait.

La méthode qPCR est un outil qui permet de détecter de façon sélective et fiable *P. freudenreichii* – principal responsable des défauts du fromage – dans les échantillons de lait cru. La détection des bactéries propioniques avec les nouvelles méthodes qPCR offre des avantages par rapport aux méthodes classiques, en particulier lors

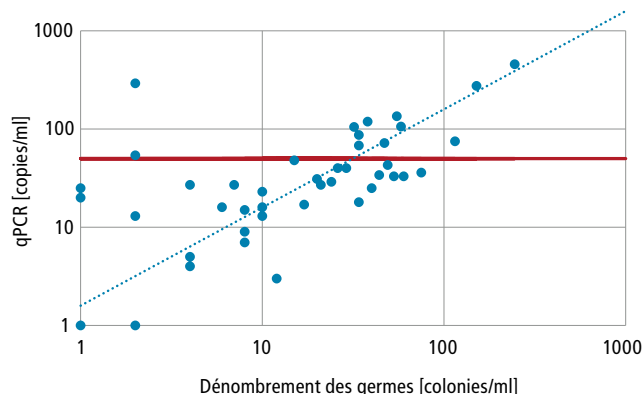


Figure 3 | Comparaison de la méthode de dénombrement des colonies et de la méthode qPCR pour les bactéries propioniques au moyen d'échantillons de lait de cuve provenant de fromageries fabriquant du fromage à pâte dure. La ligne rouge correspond à la limite inférieure de détection de la méthode qPCR (limite de détection = 50 EG/ml). Pour le dénombrement de colonies, 0,5 ml de lait a été réparti sur 5 plaques d'agar. Trois résultats avec < 2 ufc/ml ont été considérés comme 1 ufc/ml.

de l'analyse des échantillons de lait des fournisseurs. En plus de la spécificité, la durée d'analyse est nettement plus courte. Cela permet aux producteurs de réagir rapidement. Après avoir identifié et éliminé la source de contamination de leur lait, les fournisseurs concernés peuvent à nouveau livrer leur lait à la fromagerie. Le fait que les bactéries propioniques puissent entraîner une fermentation indésirable dans le fromage, même à des concentrations plus faibles que la limite inférieure de détection, reste un problème. La détection des bactéries propioniques dans les laits de mélange tels que les échantillons de lait de chaudière n'offre pas une sécurité

absolue contre les fermentations indésirables en cas de résultats négatifs. Ceci s'applique aussi bien à la détection avec la méthode microbiologique classique qu'à la détection basée sur la qPCR. Le contrôle régulier du lait de fournisseurs est donc la mesure la plus importante pour empêcher une fermentation propionique dans le fromage.

Présence et détection de *L. parabuchneri*

L. parabuchneri appartient au genre des bactéries lactiques et a été détecté dans la salive humaine, le fromage, la bière et l'ensilage. *L. parabuchneri* a également été trouvé dans des drêches de brasserie. Si le germe parvient dans les installations de traite présentant des dépôts, il peut s'y incruster et persister. Ces dernières années, de nouvelles méthodes biochimiques et issues de la biologie moléculaire ont été développées pour détecter les contaminations par *L. parabuchneri* dans le lait cru et le fromage (Berthoud *et al.* 2017). Le seuil dommageable de *L. parabuchneri* dans le lait de fromagerie est très bas. Même avec un nombre de germes situé en dessous de la limite de détection (environ 50 germes par ml), il faut s'attendre à des dégâts dans le fromage. Dans les fromages contenant de l'histamine, *L. parabuchneri* se trouve généralement à une concentration de 10^5 – 10^7 EG/g de fromage et est donc très facile à détecter en utilisant la méthode qPCR.

Dans la pratique, pour des raisons de coûts, une méthode de détection indirecte est utilisée pour détecter la présence de microorganismes produisant de l'histamine dans les échantillons de lait; cette méthode permet de détecter la formation d'histamine au moyen d'un test

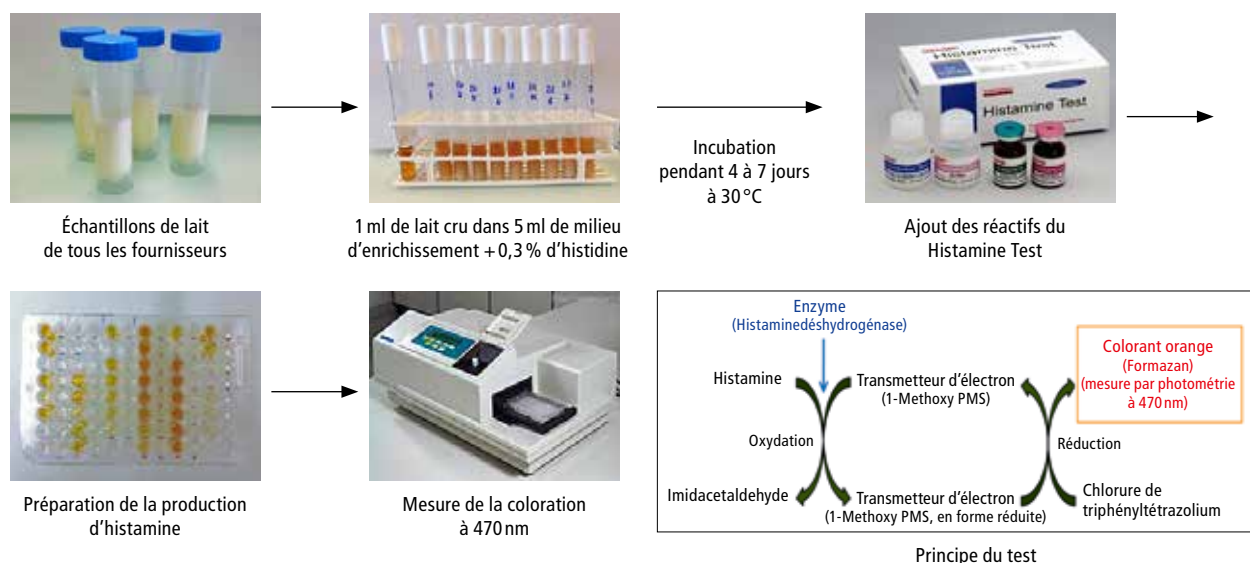


Figure 4 | Méthode enzymatique pour la détection de germes produisant de l'histamine.

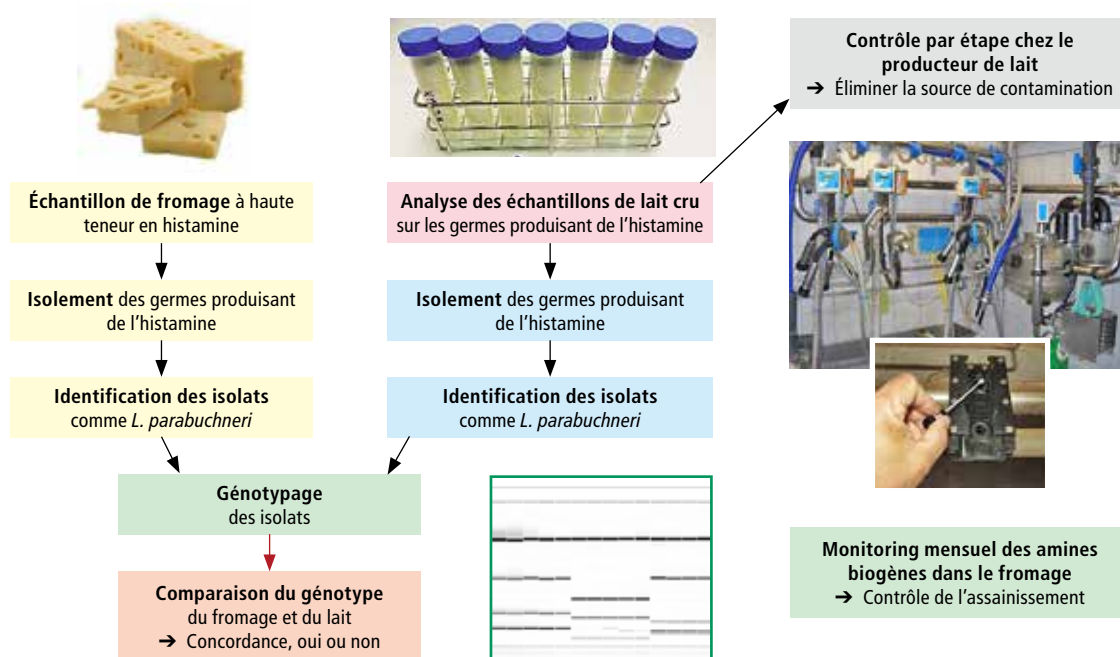


Figure 5 | Manière de procéder dans les exploitations présentant des problèmes de contamination persistante.

enzymatique. Les échantillons de lait sont incubés dans un milieu contenant de l'histidine pendant quatre à sept jours avant l'analyse. L'histamine est détectée par la formation d'un colorant orange qui est déterminé photométriquement à 470 nm (fig. 4). Dans une étude réalisée dans la pratique par Ascone *et al.* (2017), la présence de *L. parabuchneri* a été confirmée par la méthode qPCR dans 97 % des échantillons de lait cru dans lesquels la formation d'histamine était détectable.

L'expérience de la pratique montre qu'il existe des fromageries dont le fromage a une teneur en histamine constamment plus élevée. Dans de telles situations, après que des contrôles par étapes aient été effectués pour exclure toute contamination par *L. parabuchneri* dans la fromagerie, les échantillons de lait de tous les fournisseurs sont testés à plusieurs reprises pour détecter la présence de microorganismes producteurs d'histamine afin d'identifier le ou les fournisseurs dont le lait est contaminé par *L. parabuchneri*.

Le génotypage des isolats de *L. parabuchneri* permet de mettre en évidence un lien de cause à effet entre les échantillons de lait contaminés et la formation d'histamine dans le fromage. Ceci se fait selon le schéma de la figure 5: la première étape consiste à isoler les microorganismes qui produisent de l'histamine présents dans les échantillons de fromage et de lait contaminés. Les isolats peuvent être identifiés comme étant *L. parabuchneri* avant le génotypage à l'aide de la méthode qPCR spécifique à l'espèce. Une méthode développée par Berthoud *et al.* (2017) est utilisée pour procéder au génotypage des isolats. La comparaison des génotypes des échantillons de fromage et de lait permet de tirer des conclusions sur le ou les fournisseurs de lait à l'origine du problème.

Le génotypage des isolats de *L. parabuchneri* fournit également de précieuses informations quant à l'identification des sources de contamination dans les exploitations de production laitière. En comparant les profils

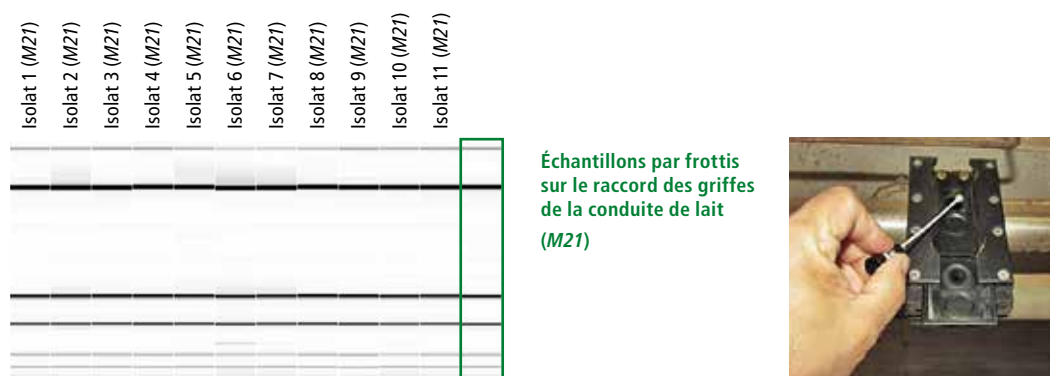


Figure 6 | Comparaison des génotypes d'isolats provenant d'un lait de fournisseur et d'un échantillon prélevé avec un écouvillon.

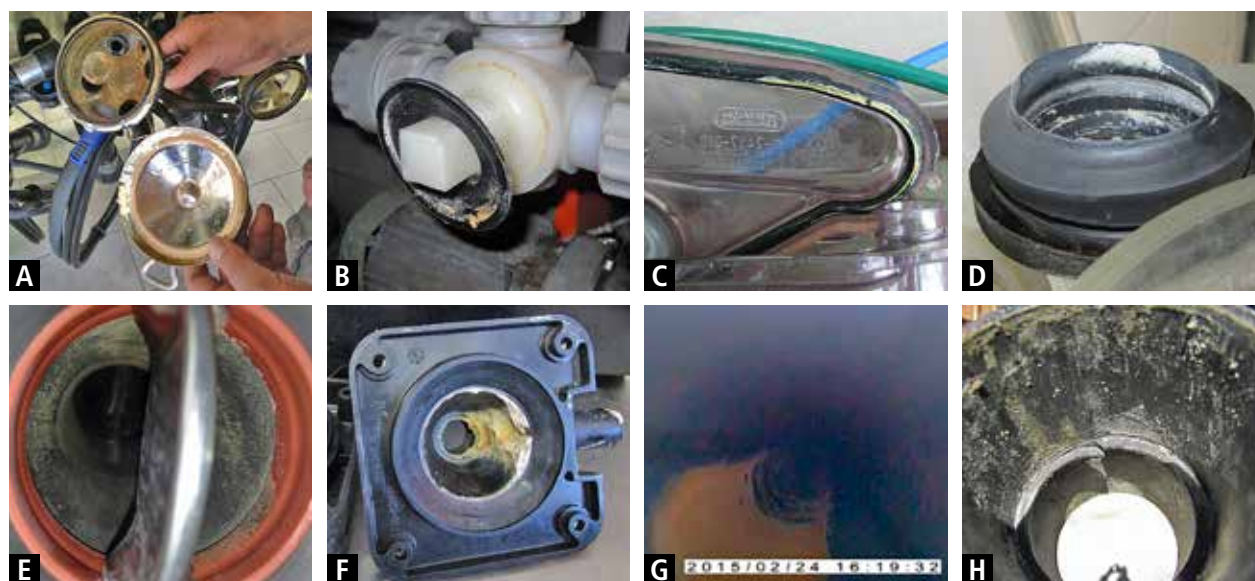


Figure 7 | Dépôts et résidus dans les différentes parties de l'installation. A: dans la griffe; B: dans la vanne à trois voies; C: dans l'appareil de mesure du volume de lait; D: dans le joint en caoutchouc de l'unité terminale; E: à la sortie de la vanne de la citerne de lait; F: dans l'injecteur d'air; G: dans la conduite de lait; H: joint défectueux d'une conduite de lait.

respectifs des échantillons de lait avec des échantillons prélevés au moyen d'un écouvillon sur les parties contaminées de l'installation, la cause du problème peut être identifiée avec précision (fig. 6).

Causes de contamination persistante dans l'installation

Des faibles nombres de germes totaux dans le lait de fabrication ne garantissent pas l'absence de contamination persistante par *L. parabuchneri* ou par des bactéries propioniques dans l'installation de traite ou dans la citerne de collecte du lait. Une contamination persistante dans une installation de traite est généralement due à l'une des causes suivantes:

- durée de nettoyage trop courte
- dosage trop faible ou application du produit de nettoyage incorrecte
- nettoyage insuffisant des parties sensibles de l'installation de traite lors de son nettoyage automatique
- absence de contrôle visuel de la propreté de l'installation de traite après le nettoyage
- entretien insuffisant de l'installation de traite (joints défectueux, parties en plastique usées et cassantes, tuyaux usés, etc.)
- service de l'installation de traite pas effectué régulièrement
- montage incorrect de l'installation
- montage incorrect des brides de raccord des tuyaux
- nettoyage insuffisant de la citerne de collecte du lait
- joints sales dans la citerne de collecte du lait (joints du brasseur, joint de la vanne).

Les causes de la contamination persistante d'une installation de traite ou de la citerne de collecte du lait par *L. parabuchneri* ou par des bactéries propioniques sont

multiples et ne peuvent être déterminées que par une inspection visuelle minutieuse des différentes parties de l'installation de traite dans l'exploitation touchée. Autrement dit, de nombreuses parties de l'installation doivent être démontées, nettoyées à la main ou remplacées. Dans certains cas, des modifications doivent également être apportées à l'installation ou au cycle de nettoyage. Les figures 7A à 7H montrent les dépôts dans différentes parties de l'installation à l'origine d'une contamination persistante.

Conclusions

Les méthodes biochimiques et de biologie moléculaire récemment mises au point par Agroscope pour la détection des microorganismes nuisibles au fromage tels que les bactéries propioniques et *L. parabuchneri* ont fait leurs preuves dans la pratique.

Des contrôles réguliers du lait des fournisseurs permettent de détecter à temps une contamination provoquée par des microorganismes indésirables et d'éviter ainsi des pertes de qualité du fromage. Si des germes producteurs d'histamine ou des bactéries propioniques sont détectés dans le lait des fournisseurs, les causes doivent être recherchées dans l'exploitation touchée et éliminées par le service régional de conseil en collaboration avec Agroscope.

Grâce aux méthodes de détection disponibles et aux connaissances acquises sur les causes des contaminations persistantes dans les installations de traite et les citernes de collecte du lait, les exploitations de production laitière et les fromageries touchées peuvent être aidées rapidement et de manière durable. ■

Riassunto**Evitare le contaminazioni persistenti di batteri propionici e *Lactobacillus parabuchneri* negli impianti di mungitura**

Le contaminazioni persistenti di batteri propionici e *Lactobacillus parabuchneri* negli impianti di mungitura provocano spesso perdite economiche nella produzione del formaggio. L'istamina nel formaggio, causata dal *Lactobacillus parabuchneri*, può inoltre compromettere la salute dei consumatori. Per poter rilevare questi germi in modo rapido e sicuro, sia nel latte di consegna che negli impianti di mungitura e nei serbatoi di latte, sono stati sviluppati e introdotti nella pratica diversi metodi biochimici e di biologia molecolare. Grazie a indagini nelle aziende di produzione del latte e al campionamento di diverse parti degli impianti di mungitura è stato possibile individuare ed eliminare le aree sensibili e le cause più frequenti di contaminazione persistente. Pertanto sono ora disponibili risorse e informazioni per aiutare in modo rapido e sostenibile le aziende di produzione del latte.

Summary**Avoiding persistent contamination with propionic acid bacteria and *Lactobacillus parabuchneri* in milking systems**

Persistent contaminations with propionic acid bacteria and *Lactobacillus parabuchneri* in milking systems have repeatedly resulted in financial losses in cheese processing. Moreover, histamine in the cheese, caused by *Lactobacillus parabuchneri*, can also affect consumer health. Biochemical and molecular biological methods have been developed and introduced into practice to enable the quick and reliable identification of these bacteria both in delivered milk as well as in milking systems and milk tanks. By investigating the milk production facilities and sampling various milking system components, sensitive areas as well as the most frequent causes of persistent contamination were successfully identified and eliminated. Means and information are therefore available to help milk-producing farms quickly and sustainably.

Key words: persistent contaminations, propionic acid bacteria, milking systems, biological methods.

Bibliographie

- Berthoud H., Wüthrich D., Bruggmann R., Wechsler D., Fröhlich-Wyder M.-T. & Irmeler S., 2017. Development of new methods for the quantitative detection and typing of *Lactobacillus parabuchneri* in dairy products. *International Dairy Journal* **70**, 65–71.
- Ascone P., Maurer J., Haldemann J., Irmeler S., Berthoud H., Portmann R., Fröhlich-Wyder M.-T. & Wechsler D., 2017. Prevalence and diversity of histamine-forming *Lactobacillus parabuchneri* strains in raw milk and cheese a case study. *International Dairy Journal* **70**, 26–33.
- Turgay M., Schaeren W., Wechsler D., Bütikofer U. & Graber H. U., 2016. Fast detection and quantification of four dairy propionic acid bacteria in milk samples using real-time quantitative polymerase chain reaction. *International Dairy Journal* **61**, 37–43.
- Turgay M., Schaeren W., Graber H. U., Wagner E., Amrein R., Bütikofer U. & Wechsler D., 2018. A field study investigating the effectiveness of vat milk controls by qPCR for the prevention of undesired propionic acid fermentation in Sbrinz PDO cheese. *International Dairy Journal* **77**, 80–88.
- Maurer J., Haldemann J., Ascone P. & Wechsler D., 2016. Empfehlungen für Produzenten von Käseemilch zur Vermeidung von Infektionen in Melkanlagen mit Propionsäurebakterien und *Lactobacillus parabuchneri*. *Agroscope Merkblatt* **1/2016**.