La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru

II. — LES STAPHYLOCOQUES

par

J. J. DEVOYOD et Liliane MILLET

Laboratoire de Recherches Fromagères (I.N.R.A.) - 15000 Aurillac

avec la collaboration de Josette KEROMNES

INTRODUCTION

Sur le milieu ETGPA de Baird-Parker (1962), *Staphylococcus aureus*, donne généralement après 24 h à 48 h d'incubation à 37° C des colonies noires, brillantes, bombées avec une bordure blanche et une zone d'éclaircissement s'étendant dans le milieu opaque. Lorsqu'on effectue à partir de ces colonies une recherche de la coagulase libre, la réaction est positive.

Au cours des analyses effectuées sur des fromages de Cantal fermiers et laitiers fabriqués à partir de lait cru, nous avons constaté la présence sur le milieu ETGPA de colonies de staphylocoques ne présentant pas la zone d'éclaircissement s'étendant dans le milieu opaque mais dont l'épreuve à la coagulase était positive. Ce type de colonies, que nous avons trouvées antérieurement dans d'autres fromages : tels que pâtes molles et « bleus » de brebis (Devoyod et Melcion, 1970 ; Devoyod et Mocquot, 1974), se rencontre de plus en plus fréquemment au cours de nos analyses bactériologiques.

De plus nous avons constaté que ces staphylocoques se rencontrent dans des échantillons prélevés sur des fromages ayant plusieurs mois d'affinage. Il semble donc que ces micro-organismes soient susceptibles tout au moins dans certaines conditions, de survivre au processus technologique de la fabrication du fromage de Cantal. Pour ces raisons, il nous a paru intéressant d'étudier d'une manière plus approfondie les caractères biochimiques et culturels de ces staphylocoques.

MATERIEL ET METHODES

a) Echantillons

Les échantillons de fromage ont été prélevés soit sur des fromages de 2 mois présentés aux différents concours régionaux, soit

sur des fromages dont nous avons suivi l'évolution bactérienne depuis l'emprésurage jusqu'à la commercialisation (Millet et Devoyod, 1975). La mise en suspension des échantillons de fromage et la méthode de dénombrement des staphylocoques ont été décrites précédemment (Millet et *al.*, 1974). Les colonies de staphylocoques étaient repiquées sur bouillon « Brain Heart Infusion » (Difco n° 37). Les souches de staphylocoques étaient conservées à + 4° C sur gélose nutritive.

b) Caractères biochimiques et cultureux

Les principaux caractères suivants ont été étudiés.

1) *Production de catalase* : une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes était déposée sur une colonie développée sur gélose nutritive pendant 24 h à 37° C afin d'observer la formation éventuelle de bulles d'oxygène.

2) *Présence de coagulase libre* : on inoculait chaque colonie de staphylocoques à essayer dans un petit tube contenant 0,3 ml de bouillon pour l'épreuve de la coagulase (Bacto Brain Heart Infusion Difco n° 37) et on incubait 20 à 24 h à 37° C. On ajoutait dans un petit tube 0,1 ml de cette culture à 0,3 ml de plasma de lapin additionné de 0,1 p. 100 d'EDTA (Bacto coagulase plasma EDTA Difco n° 803).

On incubait à 37° C et on examinait les tubes en vue de la formation d'un coagulum toutes les heures pendant 4 h puis à 24 h.

3) *Présence de DNase* (desoxyribonucléase) : on utilisait le milieu DNase BBL (BD Mérieux). On ensemait la surface du milieu coulé en boîte de Pétri, en stries radiées à partir du centre de la boîte. On incubait à 37° C pendant 24 h, puis on versait à la surface du milieu une solution d'acide chlorhydrique N. Une zone transparente autour de la strie indiquait la présence de DNase.

4) *Présence de phosphatase* : le milieu utilisé avait la composition suivante : peptone 0,5 p. 100, extrait de viande 0,5 p. 100, gélose 1,5 p. 100. A 100 ml de milieu préalablement fondu et maintenu à 45° C on ajoutait 1 ml d'une solution à 1 p. 100 filtrée sur Seitz du sel de sodium de diphosphate de phénolphtaléine.

Après avoir coulé le milieu en boîte de Pétri, on ensemait la surface du milieu en déposant une ôse d'une culture de 24 h sur bouillon cœur/cerveille et on incubait à 37° C pendant 24 à 48 h.

Une coloration rose apparue autour des colonies en atmosphère ammoniacale indiquait la présence de phosphatase.

5) *Hémolyse* : le milieu « Tryptose Blood Agar Base » (Difco n° 232) additionné de 5 p. 100 de sang de mouton défibriné a été utilisé.

6) *Fermentation du mannitol* : les souches de staphylocoques étaient cultivées sur milieu de Chapman (Mannitol Salt Agar, Difco n° 30) et l'on notait les changements de coloration du milieu.

7) *Résistance au chlorure de sodium* : les souches étaient cultivées à 37° C pendant 72 h dans le bouillon de Shaw et *al.* (1959) contenant 10 p. 100, 12,5 p. 100 et 15 p. 100 de chlorure de sodium (concentration finale).

8) *Résistance aux antibiotiques* : les souches de staphylocoques étaient cultivées sur gélose « Trypticase Soja ». Les antibiotiques suivants ont été essayés (sous forme de sensi-disques B.D. Mérieux) : pénicilline, chloramphénicol, ampicilline, terramycine, tétracycline, auréomycine, néomycine, cloxacilline, novobiocine et rifamycine.

Nous avons essayé également deux préparations vétérinaires recommandées pour le traitement des mammites l'une à base de rifamycine et l'autre à base de cloxacilline et de néomycine.

RESULTATS ET DISCUSSION

Aspect des colonies

Nous avons étudié 141 colonies développées sur milieu ETGPA, colonies noires (réduction du tellurite), bombées, lisses présentant ou non une zone d'éclaircissement (présence ou non de lipase capable d'agir sur la lipovitelline du jaune d'œuf). Cinq de ces colonies ne possédaient pas de catalase, leur identification a montré qu'il s'agissait de streptocoques du groupe D de Lancefield (ou entérocoques). L'un de nous avait signalé antérieurement que certaines souches de *Streptococcus faecalis* étaient susceptibles de donner sur milieu ETGPA des colonies d'aspect identique à celles de *Staphylococcus aureus*, toutefois aucune colonie d'entérocoques ne présentait la bordure blanche caractéristique des staphylocoques (Devoyod, 1969).

Sur les 136 souches restantes, 49 donnaient des colonies avec une zone d'éclaircissement s'étendant dans le milieu opaque, nous les considérons comme « typiques » (Buttiaux et *al.*, 1969 ; Serres et *al.*, 1973), celles que les auteurs anglo-saxons appellent « Egg yolk positive » et 87 ne présentaient pas de zone d'éclaircissement, nous les considérons comme « atypiques » (ou « Egg yolk négative »). Cette différence est bien liée à la souche et ne dépend pas du milieu de culture : nous avons trouvé en effet sur une même boîte de Pétri les deux types de colonies et les souches « atypiques » qui ont subi des repiquages successifs ont toujours présenté le même aspect : absence de zone d'éclaircissement.

Origine des souches

Dans le tableau 1, nous avons donné l'origine des souches de staphylocoques isolées.

Au début de la fabrication nous trouvions à la fois des colonies typiques et des colonies atypiques tandis que dans les fromages âgés de plus de 2 mois, les souches atypiques dominaient, aussi bien dans les fromages fermiers que dans les fromages fabriqués en

TABLEAU 1. — Origine des souches de staphylocoques

	« Tome » et fromage jeune	Fromage de plus de 2 mois
Staphylocoques « typiques » (egg yolk +)	44	5
Staphylocoques « atypiques » (egg yolk —)	34	53

laiterie. Ce résultat est intéressant, car il montre que ces staphylocoques qui donnent des colonies atypiques résistent mieux aux conditions technologiques de fabrication du Cantal que les staphylocoques donnant des colonies typiques.

Le fait que nous trouvions ces staphylocoques « atypiques » aussi bien dans les fromages fermiers que les fromages laitiers s'explique très bien. Le lait utilisé à la ferme correspond à la production d'un troupeau, tandis que le lait utilisé en laiterie correspond à la production de plusieurs troupeaux ; comme aucun traitement thermique ne vient modifier la flore microbienne du lait de fabrication, il est normal que nous ne trouvions point de différence sur le plan qualitatif entre fabrications fermières et fabrications laitières. Ces premiers résultats semblent indiquer que ces staphylocoques sont d'origine animale.

Caractères biochimiques des souches

Sur les 136 souches essayées, 128 possédaient une coagulase libre : 80 « atypiques » sur 87 (soit 92 p. 100) et 48 « typiques » sur 49 (soit 98 p. 100).

Des résultats semblables avaient été obtenus par Koskitalo et Milling en 1969 avec des souches de staphylocoques isolés de fromage de Cheddar.

Il est intéressant de noter que ce manque d'action sur le jaune d'œuf de certaines souches de staphylocoques ne dépend pas du milieu utilisé. En effet Koskitalo et Milling utilisaient comme milieu de base le milieu « *Staphylococcus medium 110* » dont la composition est bien différente de celle du milieu ETGPA de Baird-Parker que nous avons employé. Le fait qu'un nombre important de souches « atypiques » possèdent une coagulase libre montre que la présence d'une lipase capable d'agir sur la lipovitelline du jaune d'œuf n'est donc pas un caractère suffisant pour prouver la pathogénécité des souches de staphylocoques isolés de fromages sur milieu ETGPA.

Si l'on veut des résultats valables de dénombrement de staphylocoques en utilisant le milieu ETGPA, il est nécessaire, en présence de colonies noires (ou même gris très foncé) sans zone d'éclaircissement, d'effectuer sur un nombre représentatif d'entre elles (racine carrée du nombre de colonies par exemple) des épreuves de confirmation ; recherche de la coagulase libre ; si l'essai est négatif, recherche de la DNase et de la phosphatase.

Sur les 8 souches de staphylocoques qui ne possédaient pas de coagulase libre, 2 possédaient une DNase et une phosphatase, on peut donc les considérer comme potentiellement pathogènes (Buttiaux et *al.*, 1969).

Dans le tableau 2, nous avons classé les souches de staphylocoques d'après leur type d'hémolyse. Nous voyons que l'hémolyse β (zone présentant une opalescence moins grande que le reste du milieu de

TABLEAU 2. — Types d'hémolyse des staphylocoques pathogènes (hémolyse sur sang de mouton)

	Coagulase + (128 souches)			Coagulase — DNase + et phosphatase + (2 souches) pas d'hémolyse
	pas d'hémolyse	hémolyse α β $\alpha\beta$		
Souches « typiques » (egg yolk +)	10	9 13 16		—
Souches « atypiques » (egg yolk —)	28	2 12 38		2

culture et qui devient franchement hémolysée après séjour d'une nuit à froid), seule ou associée à une hémolyse α , est la plus importante (79 souches sur 130, soit 60 p. 100). Puisque l'on considère que l'hémolysine β peut être caractéristique des staphylocoques d'origine bovine (Buttiaux et *al.*, 1969), le fait qu'un nombre important des

souches de staphylocoques isolés de fromages de Cantal possèdent cette hémolysine semble confirmer l'origine animale des souches étudiées.

Toutes les souches isolées se développaient en présence de 15 p. 100 de ClNa. La résistance au chlorure de sodium ne peut donc être un critère supplémentaire qui différencie les souches « typiques » des souches « atypiques ».

Le fromage de Cantal est salé dans la masse : avant la mise en moule et pressage, la « tome » est brisée et le sel est incorporé à la dose de 2 p. 100 (en moyenne). Cette quantité de sel ne peut pas avoir un rôle sélectif sur les staphylocoques. Or, nous avons constaté (tab. 1) que les staphylocoques « atypiques » se trouvaient plus fréquemment dans les fromages au cours de l'affinage que les staphylocoques « typiques », on peut se demander si le pH du fromage ne jouerait pas un rôle sélectif.

Par biophotométrie, nous avons suivi les croissances des cultures de staphylocoques à différents pH (7,0, 6,0 et 5,0) : parmi les souches « typiques », nous avons trouvé des souches acido-sensibles et des souches acido-résistantes comme dans le cas des staphylocoques isolés de bleu de brebis (Devoyod, 1969 a) tandis que les souches « atypiques » semblent plutôt appartenir au type acido-résistant. Ces différences constatées ne sont pas néanmoins suffisamment marquées pour expliquer la disparition des souches « typiques » et le maintien des souches « atypiques » au cours de la fabrication. Il est vraisemblable que d'autres facteurs que le pH interviennent dans cette sélection.

TABLEAU 3. — Résistance des souches de staphylocoques aux antibiotiques

	Nombre de souches de staphylocoques	Nombre de souches résistantes à au moins un antibiotique
« Typiques »	48	31 (65 p. 100)
« Atypiques »	82	49 (60 p. 100)
Total	130	80 (62 p. 100)

Dans le tableau 3, nous avons porté le nombre de souches des staphylocoques résistant à un ou plusieurs antibiotiques essayés, nous voyons qu'un nombre important de souches de staphylocoques (62 p. 100) sont résistantes. On peut se demander si ce nombre

relativement important de souches résistantes et en particulier les souches « atypiques » ne proviendraient pas d'une sélection effectuée par des traitements de mammites mal faits ou à mauvais escient. Willis et *al.* (1966), Lowbury et Collins (1964) ont constaté en effet que de nombreuses souches de staphylocoques antibio-résistantes isolés dans les hôpitaux ne présentaient plus la réaction au jaune d'œuf.

Parmi les antibiotiques essayés, la pénicilline, la streptomycine, l'ampicilline et la terramycine étaient dans l'ordre les moins actifs.

Toutes les souches isolées étaient sensibles à la cloxacilline, à la rifamycine ainsi qu'aux deux préparations pharmaceutiques vétérinaires.

CONCLUSION

Pour le dénombrement des staphylocoques dans les fromages de Cantal fabriqués à partir de lait cru, l'aspect des colonies développées sur le milieu ETGPA de Baird-Parker n'est pas un critère suffisant d'appréciation de la pathogénécité des souches ; des épreuves de confirmation (recherche de la coagulase libre, de la DNase et de la phosphatase) sont nécessaires surtout lorsque les colonies ne présentent pas une zone d'éclaircissement s'étendant dans le milieu opaque.

Dans le cas des fromages de Cantal fabriqués à partir de lait cru, il serait souhaitable d'utiliser pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive un milieu permettant de reconnaître directement ces germes plutôt qu'un milieu où l'on distingue les staphylocoques d'après leur caractère hémolytique puisque 92 p. 100 des souches isolées possédaient une coagulase libre tandis que 30 p. 100 ne possédaient pas d'hémolysine réagissant sur sang de mouton.

A part la réaction sur le jaune d'œuf (présence ou non de lipase), nous n'avons pas mis en évidence de différences notables entre les souches de staphylocoques donnant des colonies « typiques » et celles donnant des colonies « atypiques ». Les conditions de développement de ces micro-organismes dans les fromages est en cours d'étude.

Résumé

136 souches de staphylocoques ont été isolées sur le milieu ETGPA de Baird-Parker, elles provenaient d'échantillons de fromage de Cantal prélevés au cours de la fabrication et de l'affinage. 87 souches ne présentaient pas la zone d'éclaircissement parmi ces souches, 80 possédaient une coagulase libre.

L'étude des caractéristiques biochimiques et culturales de ces souches a été faite : nous n'avons pas constaté de différence notable entre les souches donnant une zone d'éclaircissement (souches « typiques ») et celles ne donnant pas cette zone (souches « atypiques »).

Les souches « atypiques » se maintiennent plus longtemps dans les fromages que les souches « typiques ».

Summary

THE MICROBIAL FLORA OF CANTAL CHEESE MADE WITH RAW MILK

II. Staphylococci

136 strains of staphylococci were isolated on ETGPA medium from Cantal cheeses during cheesemaking and during the ripening period. 49 strains were « egg yolk positive » and 87 strains were « egg yolk negative ».

The biochemical and cultural characteristics of these strains were studied. 80 strains « egg yolk negative » were coagulase-positive staphylococci. « Egg yolk negative » strains were found in cheese for a longer time than « egg yolk positive » strains.

Remerciements

Nous remercions vivement le docteur Olivier de nous avoir procuré les préparations vétérinaires à usage intramammaire.

Nos remerciements vont également à MM. Plommet, Mocquot et Auclair pour leurs suggestions et leurs critiques qui ont été pour nous une aide précieuse dans l'élaboration et la présentation de ce travail.

Références bibliographiques

- [1] BUTTIAUX (R.), BEERENS (H.) et TACQUET (A.) (1969). — Manuel de techniques bactériologiques. Ed. Médic. Flammarion (3^e éd.).
- [2] DEVOYOD (J. J.) (1969 a). — La flore microbienne du fromage de Roquefort II. Staphylocoques et microcoques. *Le Lait*, 481-482, 1.
- [3] DEVOYOD (J. J.) (1969 b). — La flore microbienne du fromage de Roquefort. IV. Les entérocoques. *Le Lait*, 489-490, 637.
- [4] DEVOYOD (J. J.) et MOCQUOT (G.) (1974). — Recherche des staphylocoques à coagulase positive dans les fromages de type bleu, fabriqués à partir de lait cru de brebis. *II^e conférence sur le lait de brebis, Liptovsky Mikular* (Tchécoslovaquie).
- [5] DEVOYOD (J. J.) et MELCION (D.) (1970). — Résultats non publiés.
- [6] KOSKITALO (L. D.) and MILLING (M. E.) (1969). — Lack of correlation between egg yolk reaction in staphylococcus medium 110 supplemented with egg

yolk and coagulase activity of staphylococci isolated from cheddar cheese. *Can. J. Microbiol.*, 15, 132.

- [7] LOWBURY (E. J.) and COLLINS (B. J.) (1964). — The egg yolk reaction of *Staphylococcus aureus* isolated from burns. *J. Hyg. Camb.*, 62, 229.
 - [8] MILLET (L.) et DEVOYON (J. J.) (1975). — La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. IV. Son évolution au cours de la fabrication et de l'affinage (en préparation).
 - [9] MILLET (L.), MELCION (D.) et DEVOYON (J. J.) (1974). — La flore microbienne du fromage de Cantal fabriqué à partir de lait cru. I. Méthodes d'étude et résultats préliminaires. *Le Lait*, 537, 397-407.
 - [10] SERRES (L.), AMARIGLIO (S.) et PETRANSXIENNE (D.) (1974). — Contrôle de la qualité des produits laitiers. Tome II. Analyse microbiologique et analyse sensorielle 1^{er} groupe J. *Information Technique des Directions des Services Vétérinaires*.
 - [11] SHAW (C.), STITT (J. M.) and COWAN (S. T.) (1959). — Staphylococci and their Classification. *J. Gen. Microbiol.*, 5, 100.
 - [12] WILLIS (A. T.), SMITH (J. A.) and O'CONNOR (J. J.) (1966). — Properties of some epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Path. Bact.*, 92, 345.
-