***Penicillium roqueforti* Thom**
responsable d'un nouvel accident en fromageries
de pâtes molles

par

Micheline GUEGUEN, M. DESFLEURS
et Sylviane LEMARINIER

Laboratoire de Microbiologie, Université de Caen
14032 Caen Cedex

Pendant une longue période, le principal accident des pâtes molles a été la pousse en surface du « bleu », appelé ainsi par les fromagers qui l'attribuaient au *Penicillium roqueforti* Thom. En réalité, dans de nombreux cas, les responsables en étaient d'autres espèces, voire d'autres genres, tel *Cladosporium*. Le déclin de cet accident a commencé dès que l'on a appliqué les conclusions des travaux qui avaient été faits sur le sel [3]. Actuellement, on peut dire qu'il a totalement disparu en pratique. En revanche, ce sont les *Mucor* qui ont pris la relève.

Cependant, une nouvelle offensive vient d'avoir lieu : l'apparition d'une moisissure bleu-vert à l'intérieur du fromage, dans les cavités ou trous de moulage, sans développement extérieur (fig. 1).

1. Aspect des fromages contaminés

Cet accident s'est produit dans deux fromageries qui fabriquent des Camemberts à partir de lait cru, suivant la méthode traditionnelle, c'est-à-dire moulage à la louche.

Extérieurement les Camemberts étaient parfaits, uniformément recouverts de la couche blanche du *Penicillium caseicolum* Bainier = *Penicillium candidum* Link. Ils ne présentaient aucune tache superficielle. Signalons toutefois que nous avons observé un ou deux exemplaires ayant un point coloré quand une solution de continuité existait entre la surface et une cavité intérieure moisie.

Ces Camemberts, que rien ne distinguait des autres, étaient donc emballés et livrés aux consommateurs. Quand on les coupait, on s'apercevait que, par endroits, s'était développée dans la pâte une

fig. 1

Fromages de Camembert et de Pavé d'Auge
contaminés par *Penicillium roqueforti*.

moisissure verte, exactement comme dans certains fromages bleus de type Roquefort, mais dans le cas présent, il ne s'agissait que de quelques taches. Il n'en résultait pas moins une forte dépréciation de la marque puisqu'il était difficile d'éliminer les fromages contaminés avant l'expédition.

Dans l'une de ces fromageries, l'on avait remarqué que l'accident se produisait surtout dans les Camemberts feuilletés, c'est-à-dire ceux dont l'une des louches ne s'était pas bien ressoudée à la précédente. Cela tient le plus souvent à un temps trop long entre la mise dans le moule de deux cuillerées successives, en particulier au moment où les mouleurs vont prendre un léger repas. Le décollement était favorisé soit par le retournement manuel du fromage dans son moule en cours d'égouttage, soit par le démoulage. La partie clivée était très recouverte de « bleu ». La presque totalité des Camemberts

ainsi accidentés était éliminée par les trieurs qui, très expérimentés, se rendent parfaitement compte de l'état d'un fromage décollé.

Restaient néanmoins ceux qui n'avaient de moisissure que dans les trous de moulage. C'était uniquement le cas de l'autre fromagerie. Ce défaut y était favorisé par un mauvais égouttage, une fermentation lactique insuffisante, la présence de germes gonflants. Enfin, cet accident s'est également produit dans les Pavés d'Auge, fabriqués par une fermière de la région. Il s'agit d'une sorte de gros Pont-l'Évêque, obtenu, comme lui, à partir d'un caillé divisé de lait cru. Etant donné l'épaisseur du fromage, les morceaux se ressoudent parfois mal malgré le tassement, provoquant des trous de moulage dont les parois se recouvraient là encore de la moisissure incriminée. Du fait de sa grosseur, le Pavé d'Auge n'est généralement pas vendu à la pièce, mais par tranches. La coupe rendait le défaut visible. Notons que, dans le même temps et avec le même lait, cette fermière fabriquait des Pont-l'Évêques qui eux, étant peu épais et donc bien tassés, ne présentèrent jamais cet accident.

2. Isolement de l'agent responsable

TECHNIQUE D'ISOLEMENT

Le prélèvement de la moisissure incriminée est effectuée par grattage à l'aide d'un fil droit stérile. « L'inoculum » est alors, soit repiqué directement, soit dissocié par agitation dans 100 ml d'eau physiologique stérile, avant isolement, par la méthode des stries, à la surface de deux milieux : le milieu Czapek-Dox et un milieu à l'extrait de malt gélosé. Après incubation de 4-5 j à la température ambiante, les colonies développées sont ensemencées en tubes de malt-agar incliné et conservées au froid à + 5° C dans l'attente de l'identification.

TECHNIQUE D'IDENTIFICATION

Une suspension de spores dans de l'eau distillée stérile gélosée à 7 p. 1 000 est réalisée pour chacune des trois souches, et trois gouttes de cette suspension, disposées en triangle, sont déposées à la surface des deux milieux de culture précités coulés en boîtes de Pétri. Celles-ci sont mises à incuber à la température de 22-23° C et observées régulièrement pour étudier l'aspect macroscopique. Par ailleurs, des cultures sur lame en milieu au malt, stoppées après 36 h de développement par des vapeurs de formol, permettent l'observation précise des appareils conidifères.

RÉSULTATS

— Aspect macroscopique (fig. 2)

Sur milieu à l'extrait de malt, les colonies sont très plates, d'aspect velouté typique, légèrement zonées, de couleur bleu-vert pour les souches isolées à partir des deux Camemberts, carrément verte

fig. 2

Aspect des colonies de *P. roqueforti*

En haut et de gauche à droite : souche isolée à partir d'un Camembert, respectivement sur milieu Czapek-Dox et sur milieu à l'extrait de malt.

En bas : souche isolée à partir d'un Pavé d'Auge sur les deux mêmes milieux.

pour celle provenant du Pavé d'Auge. Elles possèdent toutes trois une marge blanche, irrégulière, arachnoïde, de 8 à 10 mm. Les colonies prennent assez rapidement de l'extension : de 30 mm de diamètre après 5 j de développement, elles passent à 40-45 mm en 7 j, 60-65 mm en 10 j. Leur revers présente tout d'abord un centre vert, un pourtour jaune-verdâtre et une marge blanche, et prend, au bout d'une semaine, une teinte verdâtre presque uniforme. On ne note ni exsudat, ni pigmentation, ni odeur caractéristique si ce n'est une légère odeur de « moisi ».

Cet aspect des colonies se retrouve sur milieu Czapek-Dox. Leur extension est toutefois moins importante : 18-20 mm en 5 j, 25-35 mm en 7 j, 50 mm en 10 j. Il convient de noter ici encore, une différence

fig. 3

Aspect des pinceaux de *P. roqueforti* (G. 800).

d'aspect macroscopique entre les souches provenant de Camembert et celle issue du Pavé d'Auge. Cette dernière, en effet, se présente pendant 5 à 6 j, sous forme de petites taches vertes bordées de blanc, qui finissent par converger, lui donnant alors un aspect proche de celui des autres souches.

— *Aspect microscopique*

- L'observation des colonies à la loupe binoculaire permet de voir des pinceaux très resserrés, portant de longues chaînes conidiennes.
- Les cultures sur lame sont observées au microscope Wild-Optik aux grossissements 100, 400 et 1 000. Il n'y a pas uniformité de structure. La plupart des pinceaux sont asymétriques peu divariqués, avec ou sans branches, ou avec différents degrés dans la complexité des ramifications. Quelques petites structures sont monoverticillées, d'autres très divariquées. Les conidiophores, courts dans l'ensemble (100-160 μ), sont très rugueux et, quelquefois même, vésiculeux. Ils

fig. 4

Conidies de *P. roqueforti* vues au microscope électronique (G. 6800).

peuvent être lisses chez les petites structures. Certains, peu nombreux, sont plus longs (230-300 μ). Leur diamètre est de 3,7-4 μ . Les metulae, légèrement rugueuses, ont une longueur de 10 à 15 μ sur une largeur de 3 μ . Les stérigmates, lisses, en forme de bouteille, ont de 9 à 12 μ sur 3 à 4 μ . Les conidies apparaissent rondes à légèrement ovoïdes, lisses ; elles ont un diamètre de 3,7 à 4,8 μ (fig. 3).

- Leur aspect a été précisé par l'étude au microscope électronique. Leur paroi, presque lisse, semble parfois porter quelques très légères équinations. Elles sont reliées entre elles par des disjoncteurs fins et très courts (fig. 4).

Toutes ces observations macroscopiques et microscopiques permettent de conclure que l'on est en présence de l'espèce *Penicillium roqueforti* Thom, ce qui était prévisible étant donné son aptitude à

pousser à l'intérieur des fromages dans une atmosphère pauvre en oxygène.

3. Causes de l'accident

On peut tout d'abord soupçonner que l'air des locaux, très chargé en conidies de *Penicillium roqueforti*, est la source de l'infection. C'est ce qui s'est produit il y a quelques années, dans une fromagerie fabriquant des Camemberts pasteurisés. Des boîtes de Pétri contenant un milieu nutritif, disposées ouvertes dans les salles de fabrication, s'étaient couvertes de cette moisissure. Une sérieuse désinfection des locaux fit cesser l'accident.

Cette fois, le même procédé ne révéla rien d'anormal. Il ne restait qu'à incriminer le lait lui-même.

L'une des fromageries ne disposant que d'un laboratoire assez simple, nous conseillâmes de faire des lacto-fermentations sur le lait des producteurs, et de garder, à température ordinaire, les tubes à essai pendant au moins 5 à 6 jours. Un bon nombre se couvrirent de la moisissure bleu-vert. Le lait était bien la source de l'infection.

Une enquête faite auprès des producteurs révéla que la plupart d'entre eux donnaient à leurs vaches de l'ensilage de maïs comme complément de nourriture.

Dans l'autre fromagerie, les laits prélevés aseptiquement furentensemencés à raison de 1 ml par boîte de Pétri contenant le milieu Potato-Dextrose-Agar. Les ensilages furent également analysés en en introduisant 100 g dans 1 litre d'eau stérile, et en ensemençant le même milieu avec 1 ml de la suspension.

Voici les résultats pour trois d'entre eux :

- Ensilage de maïs, haché fin, pH 4, bon tassage, bonne conservation : beaucoup de moisissures bleu-vert.
- Maïs haché grossièrement, pH 4,15, mauvais tassage, conservation médiocre : très nombreuses moisissures bleu-vert.
- Herbe, pH 4,2-4,3, brins longs, hachage insuffisant, mauvais tassage, taux de matière sèche important : pas de moisissure colorée.

Pour résumer les informations recueillies auprès des producteurs de lait contenant des moisissures bleu-vert, pourtant de qualité « A » habituellement, disons que traite manuelle ou mécanique, conservation en citernes réfrigérées ou bidons, paraissent sans influence. En revanche, le type d'alimentation joue un rôle majeur : si l'on a peu de moisissures incriminées avec une nourriture de foin et de concentrés, leur quantité augmente fortement avec la consommation d'un supplément d'ensilage.

Pour avoir une meilleure vue de ce qui se passait, nous avons choisi un producteur dont le lait était très contaminé. Les prélèvements aseptiques de la sécrétion de chacune des huit vaches laitières

du troupeau, du lait de la traite mécanique avant et après son transfert par tuyauterie dans la citerne réfrigérée, se révélèrent indemnes. En revanche, la prise d'un échantillon sur la totalité des traites dans le réservoir, couvercle ouvert, indiqua une contamination importante. C'était celle de la salle de traite, car les boîtes de Pétri, contenant un milieu nutritif, ouvertes à l'intérieur ou à l'extérieur aux abords immédiats se couvrirent de moisissures bleu-vert. Bien entendu, l'ensilage de maïs donna le même résultat. Les aliments concentrés ne présentèrent eux, que quelques rares colonies de moisissures.

La contamination par les conidies flottant dans l'air est évidente. La source en est principalement l'ensilage de maïs, bien qu'il ne doit pas être le seul à être mis en cause. Les accidents se sont surtout produits de la mi-janvier à la fin mars.

4. Prévention de l'accident

A l'évidence, il ne faut pas donner aux vaches laitières des aliments moisis. On doit éliminer les parties qui le sont en les manipulant avec précaution pour ne pas disséminer les conidies. On sait que *Penicillium roqueforti* se développe facilement dans les ensilages. Ceux-ci doivent être faits très correctement de manière à avoir une bonne conservation, être hachés assez finement pour être bien tassés. Enfin, si l'on se sert d'acide, il paraît préférable, d'utiliser l'acide propionique plutôt que l'acide formique ainsi qu'on le fait parfois car c'est un inhibiteur du *P. roqueforti* [2 et 4].

Dans la fabrication des fromages, il faut éviter les trous de moulage. Avoir une pâte homogène, un bon égouttage, supposent une fermentation lactique correcte.

Une des fromageries avait des gonflements dont l'une des causes était une acidification insuffisante. Ce défaut paraissait accentuer l'accident en question. Les levains du commerce se révélant incapables de donner de meilleurs résultats, on utilisa alors les ferments lactiques naturels obtenus suivant la méthode préconisée par l'un de nous [1] avec toute satisfaction. Une acidification plus rapide et plus complète donna un meilleur égouttage, une pâte plus compacte, pratiquement sans trous ni gonflement. Certes, une pasteurisation aurait détruit les conidies du *P. roqueforti*, mais, comme il s'agissait de fabrications traditionnelles en lait cru, il n'était pas question d'y recourir. Cependant, une thermisation très limitée par chauffage peu au-dessus de 55° C fut envisagée comme susceptible d'aboutir au même résultat.

On se contenta donc, d'abord, d'éliminer les laits trop contaminés, de veiller à avoir un moulage parfait, une excellente fermentation lactique et un très bon égouttage, des retournements et démoulages corrects.

Toute source de cet accident se trouva, d'ailleurs, supprimée quand les vaches n'eurent plus que l'herbe pour seule nourriture.

Résumé

Un nouvel accident dû à l'apparition d'une moisissure bleu-vert à l'intérieur du fromage, dans les trous de moulage, est rapporté ici. Il s'est produit de la mi-janvier à la fin mars 1977 dans deux fromageries qui fabriquent des Camemberts à partir de lait cru, et chez des Pavés d'Auge de fabrication fermière.

L'agent responsable est le *Penicillium roqueforti* Thom.

La source de contamination vient principalement du type d'alimentation donnée aux vaches ; en particulier, de l'ensilage de maïs apporté comme complément de nourriture.

Summary

A blue-green mould seems to have appeared inside some Camembert-cheese in the holes left by their moulding. Within the first term of 1977 — from 15th of january to the end of march. This mould was found in raw milk Camembert-cheese, and in Pavé d'Auge-cheese made at the farm.

The responsible agent is *Penicillium roqueforti* Thom.

The origin of contamination is certainly caused by the cow-food, and particularly from maize ensilage, this cereal being given as food complement.

Reçu pour publication en mars 1978.

Bibliographie

- [1] DESFLEURS (M.) et DESFLEURS (M.) (1977). — Evaluation de la teneur en germes Gram négatifs des laits et ses conséquences. *Le Lait*, 57, 375-383.
- [2] IRVINE (O.) et SPOULE (W.) (1940). — Mold inhibitors for cheese. *Canad. Dairy and Ice Cream J.*, 19, 19-25.
- [3] JACQUET (J.), VILLETTE (Mme O.), DELACROIX (J.), GONDOUIN (H.) et DESFLEURS (M.) (1957). — Considérations sur l'action du pH dans la croissance des moisissures utilisées pour la fabrication du Camembert. Rôle du sel. *Bull. Soc. Linn. Norm.*, 9^e série, 8, 115-133.
- [4] WILLINGHAM (J.) (1941). — Action of mold inhibitors on dairy products. *J. Dairy Sci.*, 16, 152-154.