Contrôle microbiologique du fromage

II. Fromage à pâte demi-dure : « Le Pategras » (Gouda argentin)

par

Silvia TESONE*, B. E. MARTINEZ* et F. QUEVEDO**

Dans un travail précédent [14], nous avons exposé les raisons qui militent en faveur de l'étude microbiologique du fromage au point de vue hygiénique et en faveur de l'établissement de normes microbiologiques destinées au contrôle de routine de ce produit alimentaire. Le Code alimentaire argentin [3] définit le « Pategras », (ou Gouda argentin), comme étant un « fromage à pâte demi-dure obtenu à partir de lait pasteurisé, entier ou standardisé, coagulé par la présure de veau et/ou à l'aide d'enzymes spécifiques et acidifié par une culture de bactéries lactiques. Le caillé est demi-cuit, moulé, pressé, salé et acidifié. La pâte du fromage est compacte, ferme, de texture élastique ; elle peut ou bien présenter quelques trous convenablement espacés ou bien ne présenter aucun trou. Le goût est doux, caractéristique, l'arôme délicat, pur, agréable, bien développé. La couleur est blanc-jaunâtre uniforme, la croûte est lisse. Le produit fini se présente sous la forme d'un cylindre aplati, de profil convexe. Le plus gros format pèse de 5 à 10 kg, et sa période de maturation minimum est de 2 mois. Le plus petit format pèse moins de 1 kg, et sa période de maturation minimum est de 1 mois ». Le fromage peut avoir entre 36 et 44 p. 100 d'humidité.

La Commission Internationale pour la Définition des Caractéristiques Microbiologiques des Aliments (ICMSF) [15] a recommandé, pour les fromages à pâte demi-dure, un plan d'échantillonnage à trois

Travail réalisé au Centre Panaméricain des Zoonoses, OPS/OMS, Casilla Correo Central 3092, (1000) Buenos Aires (Argentine).

* Instituto Nacional de Tecnología Industrial - Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Láctea - Casilla de Correo 157, San Martín, Provincia de Buenos Aires (Argentine).

** Centro Panamericano de Zoonosis, OPS/OMS, Casilla 3092, Correo Central (1000) Buenos Aires (Argentine).

classes et elle a suggéré des seuils limites de contamination pour *Staphylococcus aureus* [10]. Le Bureau Canadien de Protection de la Santé (CHPB) a proposé des seuils limites pour les coliformes totaux et fécaux et pour *Staphylococcus aureus*, en se basant sur le plan à trois classes de l'ICMSF mais en proposant des normes pour l'ensemble de tous les fromages, qu'ils soient à pâte molle, demi-dure ou dure [4].

MATERIEL ET METHODES

Echantillonnage

L'étude a été réalisée dans le laboratoire du Centre Panaméricain pour l'étude des Zoonoses. On a choisi six marques de fromages, type Pategras (Gouda argentin) parmi les plus commercialisées. Les échantillons ont été prélevés chez des détaillants, après qu'on eut contrôlé que les fromages étaient conservés à une température ne dépassant pas 10° C, selon la réglementation en vigueur. Deux entailles radiales et convergentes ont été pratiquées dans le fromage entier (d'environ 5 kg) afin d'obtenir un échantillon d'environ 750 g. Pendant 5 mois, au début de chaque semaine, six échantillons de la même marque ont ainsi été prélevés, chacun dans un magasin différent. Ils ont été envoyés immédiatement au laboratoire pour y être analysés.

Préparation des échantillons

Avec un couteau stérilisé, on a éliminé tout le pourtour de l'échantillon. Ensuite on a pesé 20 g de fromage, ce qui représentait « l'unité d'analyse ». Chacun de ces morceaux a été placé dans un mélangeur Sorvall avec 80 ml de solution de tryptone à 0,1 p. 100, puis mélangé avec le diluant pendant 15 s afin d'obtenir une suspension homogène. Différentes dilutions ont ensuite été préparées avec la même solution de tryptone. Le pH de tous les échantillons a été déterminé à l'aide d'un potentiomètre sur la première dilution.

Numération des coliformes totaux et fécaux et numération de *Staphylococcus aureus*

On a suivi la même méthodologie que lors du travail précédent sur les fromages à pâte molle [1, 7, 14].

Numération de *Bacillus cereus*

Une quantité de 0,1 ml de chaque dilution a été étalée à la surface d'une boîte de gélose au jaune d'œuf, polymixine, rouge de phénol. Une deuxième boîte a été préparée et inoculée de la même façon. Les boîtes ont été incubées à 31° C pendant 24 h. Les colonies suspectes ont été dénombrées selon les techniques habituelles [12].

Numération de *Clostridium perfringens*

Un millilitre de chaque dilution a été inoculé dans un sac en matière plastique pour anaérobiose [2] dans lequel on a ajouté 20 ml de gélose au sulfite, polymixine, sulphadiazine. Un deuxième sac a été préparé et inoculé de la même façon. Les sacs ont été incubés à 35° C pendant 24 h. Les colonies suspectes ont été reconfirmées selon les techniques habituelles [12].

Numération des streptocoques du groupe D de Lancefield

On a mélangé dans une boîte de Petri 1 ml de chaque dilution avec 15 ml de milieu gélosé de Packer. Une deuxième boîte a été préparée et inoculée de la même façon. Les boîtes ont été incubées à 37° C pendant 72 h. Les colonies suspectes développées sur les boîtes ont été reconfirmées selon les techniques habituelles [12].

Seuils limites de contamination

Avant d'effectuer les examens bactériologiques proprement dits, des « seuils limites de contamination » ont été choisis en s'inspirant des recommandations de l'ICMSF. C'est ainsi qu'on a retenu, pour les coliformes totaux et fécaux et pour *Staphylococcus aureus*, trois niveaux (ou seuils) de contamination. Le premier, désigné par « m », est le niveau de contamination (tab. 1) au-dessous duquel on peut estimer que l'échantillon provient d'une fabrication satisfaisante, c'est-à-dire d'une fabrication qui respecte les règles d'un « Code de bonnes méthodes de fabrication », et tout spécialement celles concernant la propreté bactériologique et l'hygiène.

Le second, désigné par « M » correspond au niveau au-dessus duquel l'échantillon doit être rejeté parce qu'un tel niveau de contamination est jugé inacceptable par les hygiénistes.

L'intervalle entre « m » et « M » correspond à des échantillons qui peuvent à la rigueur être acceptés, mais l'hygiéniste se réserve la possibilité de limiter le nombre « c » de tels échantillons par rapport au nombre total « n » des échantillons qui représentent le lot (par exemple $c = 2$ pour $n = 5$).

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Au total 142 échantillons de fromage type Pategras provenant de six marques différentes ont été étudiés. Les résultats obtenus ont été les suivants :

pH : les limites de variation du pH des fromages étaient 5,1 et 5,8.

NPP des coliformes totaux : la contamination par les coliformes totaux était comprise entre un NPP allant de 0 à 100/g (43,6 p. 100) et un NPP allant de 100 à 1 000/g (44,4 p. 100) (tab. 2). 12 p. 100 des échantillons présentaient un NPP supérieur à 1 000/g.

TABLEAU 1

Seuils de contamination
(nombre admissible de micro-organismes par gramme de fromage
dans chacune des catégories considérées)

Coliformes totaux	Coliformes fécaux	<i>Staphylococcus aureus</i>
m ≤ 100	≤ 100	≤ 100
> m — < M 100 — 1 000	> 100 — < 500	> 100 — < 1 000
M $\geq 1 000$	≥ 500	$\geq 1 000$

NPP des coliformes fécaux : la majorité des échantillons (74,6 p. 100), présentaient un NPP de coliformes fécaux inférieur ou égal à 100/g. Dans 14,8 p. 100 des échantillons le NPP allait de 100 à 500/g et dans 10,5 p. 100 le NPP était supérieur à 500/g (tab. 2).

Numération de Staphylococcus aureus : on a isolé *Staphylococcus aureus* dans deux échantillons de l'usine A. Le premier échantillon positif a été décelé en utilisant la méthode d'enrichissement sur milieu de Giolitti et Cantoni et le second au moyen de la méthode de dénombrement direct (50 ufc*/g). Les usines B et E présentaient, respectivement, 2 et 3 échantillons positifs pour *Staphylococcus aureus* avec 50 ufc/g. Enfin, dans 7 échantillons de la fromagerie F, les dénombrements de *Staphylococcus aureus* allaient de 50 à 1 000 ufc/g. Dans les échantillons provenant des usines C et D le dénombrement a toujours été inférieur à 50 ufc/g.

Numération de Bacillus cereus : le dénombrement de *Bacillus cereus* a été effectué sur 35 échantillons. Pour 24 d'entre eux, le dénombrement était inférieur à 50 ufc/g et dans les 11 restants, le dénombrement se situait entre 50 et 150 ufc/g.

* ufc : unité formant une colonie.

TABLEAU 2

Nombre d'échantillons de fromages « Pategras » répartis par groupe de micro-organismes et selon le niveau de contamination (par gramme de fromage) dans six fromageries

Fromageries	Nombre d'échantillons	Coliformes totaux			NMP de coliformes fécaux			<i>Staphylococcus aureus</i>			
		≤100	>100 — <1000	≥1000	≤ 100	> 100 — < 500	≥ 500	≤100	>100 — <1000	≥1000	
A	24	15	8	1	18	6	0	24	0	0	
B	24	9	15	0	21	3	0	24	0	0	
C	24	13	10	1	17	1	6	24	0	0	
D	24	7	9	8	15	5	4	24	0	0	
E	24	6	17	1	20	4	0	24	0	0	
F	22	12	4	6	15	2	5	20	2	0	
Nombre total d'échantillons et pourcentage correspondant		142/100	62/43,6	63/44,4	17/12,0	106/74,6	21/14,8	15/10,5	14/98,4	2/1,4	0/0

fig. 1

Fréquence de distribution du fromage type Pategras en fonction du log. NPP/g de coliformes totaux.

Numération des Streptococcus du groupe D de Lancefield : sur 33 des 38 échantillons étudiés, le dénombrement allait de 4×10^4 ufc/g à 3×10^6 ufc/g. Sur les 5 autres échantillons, les résultats ont été négatifs.

fig. 2

Fréquence de distribution du fromage type Pategras en fonction du log. NPP/g de coliformes fécaux.

Numération de Clostridium perfringens : sur un total de 46 échantillons examinés, 6 seulement présentaient une contamination avec *C. perfringens* et le dénombrement a toujours été de 50 ufc/g.

Histogrammes de fréquence : les figures 1 et 2 représentent les fréquences de contamination des échantillons en fonction, respective-

ment, du logarithme du NPP de coliformes totaux et du logarithme du NPP de coliformes fécaux, pour chaque fromagerie.

DISCUSSION

Nous n'avons pas trouvé de relation entre le pH des fromages et le niveau de contamination.

Les histogrammes de fréquence des coliformes totaux et fécaux obtenus pour le fromage type Pategras reflètent à la fois la propreté bactériologique générale de chaque fromagerie et aussi celle du fromage proprement dit. Les fromages provenant de la fromagerie B ont présenté une qualité homogène tout au long du travail (fig. 1). La contamination par les coliformes fécaux était faible, le NPP a toujours été inférieur à 500 ufc/g (fig. 2).

Les échantillons de la fromagerie E possédaient aussi une qualité homogène mais leur taux de contamination était supérieur à celui de la fromagerie B, quoique le NPP de coliformes fécaux ait, lui aussi, toujours été inférieur à 500 ufc/g.

Les échantillons des autres fromageries possédaient une qualité variable d'un échantillon à l'autre. Cette variabilité peut être due soit à la qualité variable des fabrications provenant, chacune, d'un atelier différent de la même fromagerie, soit au fait que les fromages analysés n'étaient pas toujours du même âge. L'échantillonnage chez les détaillants ne nous a pas permis, en effet, d'avoir des indications sur l'un ou l'autre de ces points. On doit remarquer également que l'échantillon représentait environ 1/8 du fromage entier et que la distribution des micro-organismes dans la pâte peut ne pas être uniforme.

Quant au niveau global de contamination, on remarque que près de 90 p. 100 des échantillons avaient un NPP de coliformes totaux inférieur ou égal à 1 000/g et un NPP de coliformes fécaux inférieur à 500/g (tab. 2). Dans plusieurs échantillons le nombre des coliformes fécaux était inférieur d'un logarithme à celui des coliformes totaux ; mais dans 60 p. 100 des échantillons où le NPP de coliformes totaux était supérieur à 100/g, le NPP des coliformes fécaux était du même ordre de grandeur que celui des coliformes totaux.

Une contamination significative (de 50 à 1 000/g) avec *S. aureus* a été décelée dans 7 échantillons de la fromagerie F. Dans ces mêmes échantillons, le dénombrement des coliformes était inférieur à 30/g. Environ 98 p. 100 des échantillons étudiés se trouvaient à un niveau inférieur ou égal à la valeur « m » mentionnée dans le tableau 1, c'est-à-dire à un niveau inférieur ou égal à 100 ufc/g. On sait que les recherches effectuées sur *Bacillus cereus* ont indiqué une implication possible de ces bactéries dans certains cas d'intoxication alimentaire [5]. Etant donné que la fréquence de contamination des fromages par *B. cereus* et l'importance de cette contamination ne sont

pas connues, nous avons effectué des recherches sur les fromages du type Pategras. Bien que le niveau de contamination observé pour *B. cereus* ait été, en général, faible, il nous a paru intéressant de le déterminer car il faut considérer que la germination des spores peut être activée par la chaleur et notamment par des traitements thermiques sublétaux [9], et que des intoxications peuvent résulter de la présence de toxine préformée [8].

La présence de *Streptococcus* du groupe D est considérée comme un indice de mauvaise qualité hygiénique chez certains produits laitiers [13], mais l'interprétation de la présence de ce type de micro-organismes est difficile à cause de leur résistance à la chaleur, à la déshydratation, etc., et aussi en raison du fait qu'ils sont dans certains cas utilisés avec les levains lactiques pour la fabrication de plusieurs types de fromages où ils jouent un rôle au cours de la maturation [8]. Il existe en particulier des Gouda sud-africains qui présentent un niveau de contamination par les *Streptococcus* du groupe D semblable à celui qui a été observé dans notre étude [16].

Nous avons comparé nos résultats (tab. 3) avec ceux du CHPB [11] et avec ceux de Frank *et al.* [6].

TABLEAU 3

Distribution comparée, en pourcentage (par gramme de fromage) des nombres de coliformes totaux et de coliformes fécaux pour les fromages à pâte demi-dure au Canada (CHPB), aux Etats-Unis (Frank *et al.*) et en Argentine (CPZ)

	Coliformes totaux			Coliformes fécaux		
	≤100	>100 — <1000	≥1000	≤100	>100 — <1000	≥1000
CPZ	43,6	44,4	12,0	74,6	14,8	10,5
CHPB [4]	75,8	10,6	13,6	98,2	1,0	0,8
Frank <i>et al.</i> [6]	—	—	—	52,0	14,8	33,2

Si nous appliquons au fromage type Pategras les seuils proposés par le CHPB (coliformes totaux $m = 500$, $M = 1\,500$; coliformes fécaux $m = 100$, $M = 500$; *S. aureus* $m = 100$, $M = 1\,000$) le pourcentage de nos échantillons qui serait accepté s'élève à 85,3 p. 100. Si nous utilisons nos propres « seuils limites » (tab. 1) en retenant les échantillons pour lesquels les trois déterminations ont été au-dessous du seuil M , le pourcentage accepté s'élève à 74 p. 100. D'autre part, si l'on juge nos résultats selon les critères de l'ICMSF, tous les échantillons analysés dans notre étude seraient acceptés, car le seul critère

que ce Comité propose est le nombre de *S. aureus* par g et le seuil limite suggéré est supérieur aux chiffres que nous avons obtenus sur nos échantillons. Des indications plus détaillées sont données dans le tableau 3. Etant donné que la présence d'un grand nombre de coliformes dans les fromages représente un risque potentiel, et qu'il est également un indice de pratiques hygiéniques défectueuses, l'industrie laitière doit s'efforcer de réduire cette contamination, soit avant, soit pendant la fabrication et améliorer les conditions d'hygiène de façon à parvenir au résultat souhaité.

Il est donc finalement souhaitable, qu'au niveau de la fabrication, les fromages présentent un taux de contamination inférieur à celui que nous avons observé chez les détaillants et que ces mêmes fromages ne dépassent pas les « seuils limites de contaminations » suggérés dans la présente étude.

Remerciements

La présente étude a été effectuée dans le cadre d'un accord entre le CITIL et le Centre Panaméricain des Zoonoses (OPS/OMS).

Nous remercions, en premier lieu, les ingénieurs J. O. Casale et O. Mendi-zabal (CITIL) pour leur précieuse collaboration pendant la réalisation de ce travail.

Nous remercions également le Dr N. Marchevsky (CEPANZO) pour la présentation des résultats sur le plan statistique.

Nous remercions enfin, le Dr G. Mocquot, pour son aide dans la présentation du manuscrit en langue française.

Reçu pour publication en juillet 1980.

Résumé

Cent quarante deux échantillons de fromage de type « Pategras » (une variété de Gouda argentin), qui provenaient de six fromageries représentatives de la production locale ont été étudiés. Le but de ce travail était de recueillir un certain nombre de données concernant le niveau de contamination de ces fromages à pâte demi-dure. On espère que de telles données permettront ensuite d'orienter les choix à faire en ce qui concerne les « seuils limites de contamination » admissibles.

Au préalable on a retenu certaines valeurs pour les « seuils de contamination » et on a effectué ensuite le dénombrement des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des staphylocoques à coagulation positive. En outre, on a aussi effectué, dans plusieurs échantillons, le dénombrement de *Bacillus cereus*, des *Streptococcus* du groupe D de Lancefield et de *Clostridium perfringens*. Selon le résultat de ces dénombrements, les échantillons ont été répartis pour chaque type de micro-organismes en trois groupes.

En ce qui concerne les coliformes totaux, 43,6 p. 100 des échantillons se trouvaient dans la catégorie « $\leq m$ », 44,4 p. 100 dans la catégorie « $> m$ et $< M$ » et 12 p. 100 dans la catégorie « $\geq M$ ». En ce qui concerne le niveau de contamination en coliformes fécaux, 74,6 p. 100 appartenaient à la catégorie « $\leq m$ », 14,8 p. 100 à la catégorie « $> m$ et $< M$ » et 10,5 p. 100 à la catégorie « $\geq M$ ». Quant aux staphylocoques à coagulase positive, 98,4 p. 100 des échantillons ont été classés dans la catégorie « $\leq m$ » et seulement 1,4 p. 100 dans la catégorie « $> m$ et $\leq M$ ».

Les dénombrements des autres catégories de micro-organismes mentionnés n'ont pas été réalisés pour tous les échantillons. Les résultats obtenus dans plusieurs échantillons apportent cependant des informations utiles.

Nos résultats ont été comparés à ceux de travaux similaires effectués au Canada et aux Etats-Unis, presque en même temps que notre étude. En appliquant à nos échantillons les critères de jugement proposés par le Canada et l'ICMSF, on a pu observer que le pourcentage d'échantillons acceptables est de 85,3 p. 100 selon le critère canadien et de 100 p. 100 selon le critère de l'ICMSF.

Summary

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF CHEESE.

II. SEMI-HARD CHEESE «PATEGRAS» OR ARGENTINIAN GOUDA

A study was made of 142 samples of Argentine «Pategras» (a Gouda variety of cheese) from six local representative brands to obtain information on the degree of microbial contamination of semi-hard cheeses and to collect data which could prove useful for the development of microbiological limits for control.

Microbiological guidelines were selected prior to laboratory work; total coliforms, faecal coliforms and coagulase-positive *Staphylococcus aureus* were enumerated. In addition, enumeration of *Bacillus cereus*, Lancefield's group D streptococci and *Clostridium perfringens* were also performed on some samples. On the basis of the results obtained, for each type of micro-organisms the samples were grouped into three classes.

For total coliforms 43.6 p. 100 of the samples belonged to class « $\leq m$ », 44.4 p. 100 to class « $> m$ and $< M$ » and 12 p. 100 to class « $\geq M$ ». For faecal coliforms, 74.6 p. 100 of the samples were classified in « $\leq m$ », 14.8 p. 100 in « $> m$ and $\leq M$ » and 10.5 p. 100 in « $\geq M$ ». Counts for coagulase-positive staphylococci revealed that 98.4 p. 100 were in class « $\leq m$ ».

For the other microorganisms examinations were not carried out on all samples. But the results obtained in some cases proved useful.

The results obtained in the present study were compared with those of similar research works carried out almost simultaneously in Canada and the United States. Our samples were classified on the basis of criteria proposed in Canada and by the ICMSF. Eighty five per cent of the samples were acceptable according to the Canadian standard, and 100 p. 100 according to the ICMSF standard.

Bibliographie

- [1] BAIRD PARKER (A. C.) (1969). — The use of Baird Parker's medium for isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: Isolation methods for microbiologists. Shapton (D. A.), Gould (G. W.) eds. Academic Press, London, 1-8.
- [2] BLADEL (B. O.) and GREENBERG (R. A.) (1965). — Pouch method for the isolation and enumeration of *Clostridia*. *Appl. Microbiol.*, 13, 281-285.
- [3] Codigo Alimentario Argentino. Edicion actualizada. Buenos Aires, Camara de Comercio (1977).
- [4] COLLINS-THOMPSON (D. L.), ERDMAN (I. E.), MILLING (M. E.), BURGNER (D. M.), PURVIS (U. T.), LOIT (A.) and COULTEN (R. M.) (1977). — Microbiological standards for cheese: survey and viewpoint of the Canadian Health Protection Branch. *J. Food Protection*, 40 (6), 411-414.
- [5] DAVIES (F. L.), WILKINSON (G.) (1973). — *Bacillus cereus* in milk and dairy products. In: B. C. Hobbs and J. C. Christian eds. The microbiological safety of food. London, Academic Press.
- [6] FRANK (J. F.) and MARTH (E. H.) (1978). — Survey of soft and semisoft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Food Protection*, 41 (3), 198-200.
- [7] GIOLITTI (G.) and CANTONI (C.) (1966). — A medium for the isolation of staphylococci from foodstuffs. *J. Appl. Bact.*, 29 (2), 395-398.
- [8] GOEPFERT (J. M.), SPIRA (W. M.), GLATZ (B. A.) and KIM (H. V.) (1973). — Pathogenicity of *Bacillus cereus*. In: B. C. Hobbs and J. C. Christian. The microbiological safety of food. London, Academic Press.
- [9] GOEPFERT (J. M.), SPIRA (W. M.) and KIM (H. V.) (1972). — *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review. *J. milk Food Technol.*, 35 (4), 213-227.
- [10] INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF) (1974). — Microorganisms in Foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. Canada, University of Toronto Press.
- [11] JENSEN (J. P.), REINBOLD (G. W.), WASHAM (C. J.) and VEDAMUTHU (E. R.) (1973). — Role of enterococci in Cheddar cheese: growth of enterococci during manufacturing and curing. *J. Milk Food Technol.*, 36 (12), 613-618.
- [12] MOSSEL (D. A. A.), QUEVEDO (F.) (1967). — Control microbiológico de los alimentos. Metodos recomendados. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- [13] SHANNON (E. L.), REINBOLD (G. W.) and CLARK Jr (W. S.) (1975). — Heat resistance of enterococci. *J. Milk Food Technol.*, 38 (10), 192-196.
- [14] TESONE (S.), QUEVEDO (F.) (1978). — Contrôle microbiologique du fromage. I. Fromage à pâte molle : « Le Cuartirolo ». *Le Lait*, 58, 43-56.
- [15] THATCHER (F. S.) and CLARK (D. S.) (1968). — Microorganisms in Food: their significance and methods of enumeration. Canada, University of Toronto Press.
- [16] HOLZAPFEL (W. H.), MOSTERT (J. F.) (1973). — In Mikrobiologiese studie van Suidafrikaanse Goudakass. II. *S. Afr. J. Dairy Technol.*, 5, 203-207.