

Contrôle microbiologique du fromage

I. FROMAGE A PATE MOLLE : « LE CUARTIROLO »*

par

Silvia TESONE** et F. QUEVEDO***

Le fromage est un aliment d'importance croissante sur le marché international [14]. Bien qu'il soit rarement source d'intoxications alimentaires, on l'a récemment accusé d'en avoir causé de graves [5, 6, 15, 17].

Par conséquent, les circonstances actuelles rendent nécessaire l'établissement de normes microbiologiques afin de faciliter le commerce international et en même temps de protéger la santé du consommateur. Malheureusement, il existe très peu d'articles sur le contrôle microbiologique du fromage que l'on puisse utiliser comme base de telles normes. Dans le cas des fromages à pâte molle, il existe bien peu de renseignements, comme l'a d'ailleurs reconnu la Commission Internationale des Caractéristiques Microbiologiques des Aliments (I.C.M.S.F.) dans sa publication la plus récente [11]. Nous n'avons pu trouver que très peu d'articles traitant ce sujet [8, 9, 12].

L'Argentine est un important producteur de fromage, avec une production annuelle de 218 400 t [3] dont un petit pourcentage seulement est exporté. Les fabricants de fromage consacrent tous leurs efforts, avec l'aide d'un centre spécialisé (C.I.T.I.L.), à améliorer la qualité du produit fini. Plusieurs études ont fait l'objet de publications à la suite de ces travaux [1]. La présente étude sur le « Cuartirolo » est la première d'une série de communications ayant pour sujet le contrôle microbiologique du fromage argentin.

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

** C.I.T.I.L., Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Lactea. Buenos-Aires (Argentina).

*** Centre Panaméricain des Zoonoses. Buenos-Aires (Argentina).

Nous avons choisi cette variété de fromage en raison de sa production élevée (environ 38 000 t par an) parmi tous les fromages à pâte molle. Il nous a semblé que les résultats obtenus pourraient aider utilement à la fixation de caractéristiques microbiologiques pour ce type de fromage.

Le code alimentaire argentin [2] définit le « Cuartirolo argentin » comme étant un fromage de type pâte molle 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 non chauffé est moulé, pressé, salé et affiné. La masse est lisse, d'un blanc jaunâtre uniforme, la texture est assez élastique, la pâte ne présente pas de trous, le goût est légèrement acide, l'odeur fine et agréable.

La croûte possède une certaine consistance, elle est uniforme, soit lisse, soit rugueuse. Le produit fini présente la forme d'un cylindre aplati ou d'un parallépipède. Le plus gros format pèse de 2,5 à 5 kg, avec une période de maturation minimum de 1 mois ; le plus petit format pèse moins de 2,5 kg, avec une période de maturation minimum de 20 j. Cette variété de fromage peut contenir jusqu'à 55 p. 100 d'humidité et 30 à 50 p. 100 de matière grasse dans la substance sèche.

Au cours de la présente étude, nous nous sommes bornés à isoler les germes indicateurs des conditions d'hygiène, compte tenu des règlements sanitaires ; en outre nous avons vérifié la présence ou l'absence de certains germes d'importance particulière, qui peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires.

MATERIEL ET METHODES

I. Echantillons

On a choisi six marques de fromage représentatives. Les échantillons ont été pris chez des détaillants après qu'on eut contrôlé que le produit était conservé au froid à une température inférieure à 10° C, selon la réglementation en vigueur. Deux entailles radiales et convergentes ont été pratiquées dans un fromage entier, (4 000 g) afin d'obtenir un échantillon d'environ 500 g. Au début de chaque semaine pendant 6 mois, des échantillons de la même marque ont été prélevés, chaque fois dans cinq magasins différents, et ont été immédiatement envoyés au laboratoire pour y être étudiés.

II. Préparation des échantillons

A l'aide d'un couteau stérile on a éliminé une couche d'environ 1,5 cm d'épaisseur sur tout le pourtour du fromage. Ensuite on a

prélevé un fragment de fromage avec une sonde stérile et on en a pesé 20 g. Ceci constituait l'unité d'analyse*.

Le morceau a été placé dans un mélangeur avec 80 ml de solution de tryptone à 0,1 p. 100 [13] ; le tout a été ensuite mélangé pendant 15 s dans un omnimixeur Sorvall. Différentes dilutions ont été ensuite préparées avec la même solution de tryptone.

Le pH de tous les échantillons a été déterminé à l'aide d'un potentiomètre.

III. Détermination du nombre le plus probable (NPP) de coliformes totaux et fécaux

Le bouillon de culture utilisé était le bouillon lactosé bilié au vert brillant à 2 p. 100 (BGLBB). Trois dilutions successives ont été inoculées dans deux séries de trois tubes contenant le BGLBB à 2 p. 100. Les tubes ont été placés dans un incubateur à $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pour les coliformes totaux et à $45,5^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pendant 48 h dans un bain-marie agité pour les coliformes fécaux [18]. La présence de coliformes totaux dans les tubes positifs a été confirmée par l'inoculation en stries d'une gélose à l'éosine bleu de méthylène (EMB) et par des épreuves biochimiques supplémentaires. Quant aux coliformes fécaux, leur présence dans les tubes positifs a été confirmée par le test de Mac Kenzie Gilbert et Taylor [18]. Le NPP a été calculé ensuite d'après la table en rapportant les valeurs obtenues à 1 g d'échantillon de fromage.

Numération de Staphylococcus aureus

Une quantité de 0,1 ml de chaque dilution a été inoculée à la surface de deux boîtes de gélose Baird-Parker [4] et étalée avec un étaleur en métal.

Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 48 h. L'épreuve de la coagulase a été effectuée sur un nombre représentatif de colonies positives suspectes.

Un gramme de tous les échantillons pour lesquels l'épreuve précédente était négative a été inoculé dans 19 ml de milieu liquide de Giolitti et Cantoni [10] incubé à 37°C pendant 48 h et ensuite inoculé en stries sur des boîtes de milieu de Baird-Parker.

Isolement des salmonelles

Deux échantillons de fromage de 25 g ont été respectivement mélangés, l'un à 100 ml de bouillon sélénite et l'autre à du bouillon au tétrathionate et incubés dans un bain-marie à, respectivement,

* Unité d'analyse : la portion individuelle choisie au hasard et sur laquelle on effectue les analyses.

43° C et 35° C. Après une incubation de 24 à 48 h, une anse de chaque culture d'enrichissement a été étalée sur des boîtes de gélose au vert brillant incubées à 35° C pendant 24 h.

Les colonies suspectes ont été étudiées et testées grâce aux techniques biochimiques habituelles [16].

Evaluation des moisissures et des levures viables

Une gélose glucosée à l'oxytétracycline [16] fondue et refroidie a été mélangée à 1 ml de chaque dilution, les dilutions ayant été réparties au préalable dans deux séries de boîtes de Petri. Ces boîtes ont été incubées à 22° C pendant 7 j.

Critères expérimentaux :

— des « critères expérimentaux » ont été établis avant d'effectuer le travail de laboratoire. On a établi trois degrés de contamination (élevé, moyen et bas) pour les coliformes totaux et fécaux et pour les staphylocoques à coagulase positive. Ces seuils de contamination sont comparables à ceux que recommandait récemment l'I.C.M.S.F. [11] dans son plan d'échantillonnage en trois catégories. Ainsi, notre évaluation « élevée » correspondrait à la catégorie que le Comité désigne comme supérieur à M, l'évaluation « moyenne » se situerait entre m et M et l'évaluation « basse » serait inférieure à m (tab. 1) ;

TABLEAU 1. — Critères expérimentaux

	Coliformes totaux NPP/g	Coliformes fécaux NPP/g	Staphylocoques à coagulase positive col/g
Dénombrement bas $\leq m$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$	$\leq 10^2$
Dénombrement moyen $> m - \leq M$	$> 10^2 - \leq 10^5$	$> 10^2 - \leq 10^4$	$> 10^2 - \leq 10^4$
Dénombrement élevé $> M$	$> 10^5$	$> 10^4$	$> 10^4$

— on a établi, pour tous les échantillons, le NPP des coliformes totaux et fécaux et le nombre des staphylocoques à coagulase positive. Le dénombrement des moisissures et des levures et l'isolement des salmonelles ont été effectués sur un échantillon chaque semaine.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

Au total cent-dix-sept échantillons provenant de six marques différentes ont été étudiés. Les résultats obtenus ont été les suivants :

pH : les limites de variation du pH des fromages allaient de 5,0 à 5,2.

NPP des coliformes totaux : seulement 1,7 p.100 de l'ensemble des échantillons étudiés ont révélé un taux « bas » ; 65,8 p.100 un taux « moyen » et 32,5 p.100 ont un taux « élevé » (fig. 1). Les taux

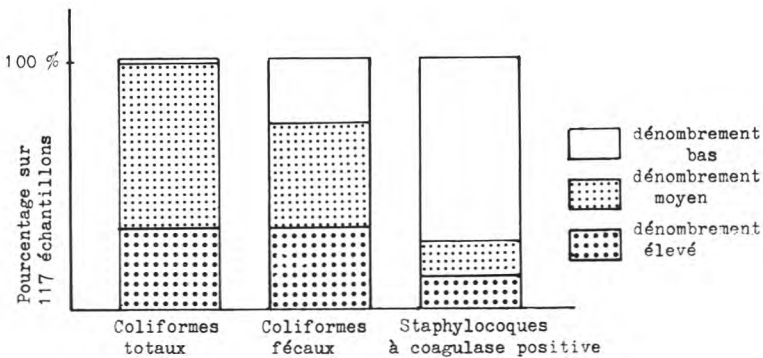


fig. 1

Pourcentage du nombre total d'échantillons pour chaque niveau de contamination et pour chaque groupe de micro-organismes.

inférieurs à 100 par g ont été trouvés seulement dans les échantillons provenant de la fromagerie A. Aucun des échantillons en provenance de cette même fromagerie n'a révélé de taux supérieur à 10^5 par g. Par contre, tous ceux provenant de la fromagerie F ont révélé des taux supérieurs à 10^5 par g (tab. 2, fig. 2).

NPP des coliformes fécaux : 25,6 p.100 des échantillons ont révélé des taux « bas », 41,9 p.100 des taux « moyens » et 32,5 p.100 des taux « élevés » (fig. 1).

Tous les échantillons provenant de la fromagerie F comportaient des taux supérieurs à 10^4 par g (tab. 2, fig. 3).

Numération de Staphylococcus aureus : 78 p.100 des échantillons étudiés ont révélé des taux « bas » ou l'absence de staphyloco-

TABLEAU 2

Nombre des échantillons selon le groupe de micro-organismes
et le niveau de contamination, dans six fromageries

Fromageries	Nombre des Echantillons	Coliformes totaux			Coliformes fécaux			Staphylocoques à coagulase positive		
		bas	moyen	élevé	bas	moyen	élevé	bas	moyen	élevé
A	18	2	16	0	9	6	3	16	0	2
B	19	0	18	1	8	10	1	11	6	2
C	19	0	8	11	0	14	5	18	1	0
D	21	0	14	7	8	6	7	21	0	0
E	20	0	19	1	5	13	2	16	0	4
F	20	0	0	20	0	0	20	0	11	9

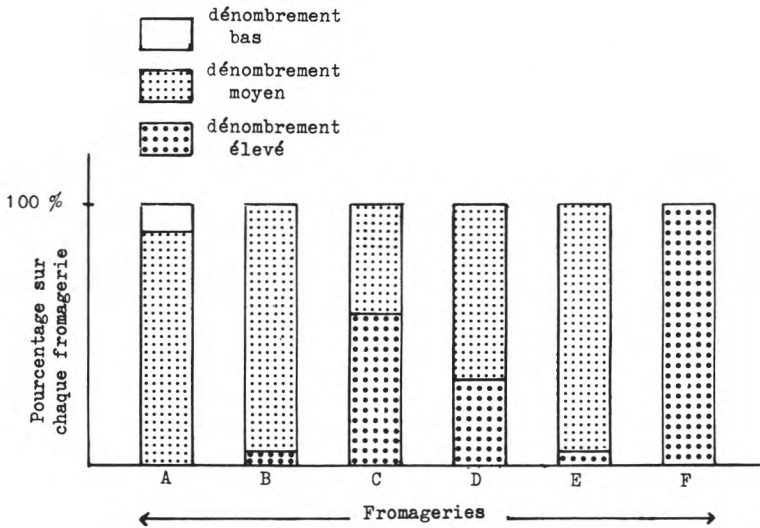


fig. 2

Pourcentage des échantillons de chaque fromagerie selon le niveau de contamination en coliformes totaux.

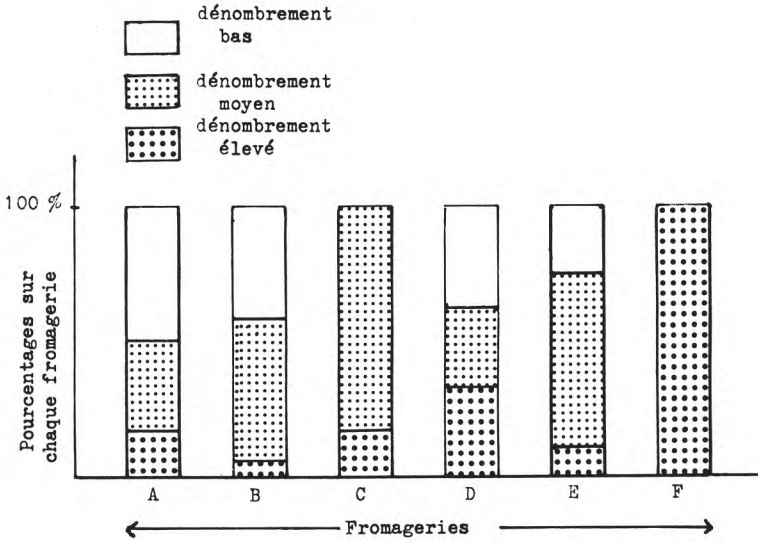


fig. 3

Pourcentage des échantillons de chaque fromagerie selon le niveau de contamination en coliformes fécaux.

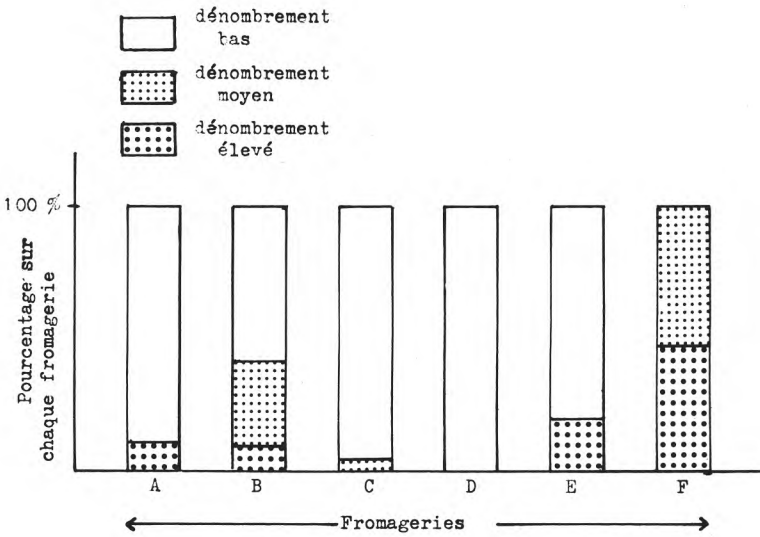


fig. 4

Pourcentage des échantillons de chaque fromagerie selon le niveau de contamination en *Staphylococcus aureus*.

ques. Tous les échantillons provenant des fromageries C et D présentaient des nombres inférieurs à 10^2 par g, à l'exception d'un seul échantillon provenant de la fromagerie C et dont le nombre était de 9×10^3 par g. C'est parmi les échantillons fournis par la fromagerie F que l'on a constaté le pourcentage le plus élevé (46,6 p. 100) en numération supérieure à 10^4 par g (tab. 2, fig. 4).

Isolement des salmonelles : on a détecté la présence d'aucune salmonelle dans les échantillons étudiés. Néanmoins, dans certains d'entre eux on a mis en évidence la présence de micro-organismes du genre *Proteus*.

Nombre de moisissures et levures viables : des nombres supérieurs à 10^6 par g ont été mis en évidence dans dix-huit des vingt-quatre échantillons examinés (tab. 3). La proportion entre levures et moisissures a été établie approximativement à 100 : 1.

TABLEAU 3. — Moisissures et levures viables

Moisissures et levures/g	Echantillons (nombre)
10^2	1
10^3	1
10^4	3
10^5	1
10^6	9
10^7	9

Classement des échantillons : les échantillons de chaque fromagerie ont été classés d'après les trois paramètres suivants : à la fois le NPP des coliformes totaux, le NPP des coliformes fécaux et le nombre des *S. aureus* ; les mêmes critères expérimentaux utilisés pour chaque épreuve individuelle ont été appliqués au classement de l'ensemble des échantillons : ainsi les échantillons pour lesquels l'une des trois épreuves avait révélé un nombre « élevé » ont été mis dans la catégorie « élevé » ; ceux pour lesquels les trois épreuves avaient mis en évidence un nombre moyen ou une combinaison de « moyen » et de « bas », ont été classés dans la catégorie « moyen » et ceux qui n'ont révélé que des taux bas dans la catégorie « bas ».

On a observé que 1,7 p.100 de tous les échantillons étudiés appartenaient à la catégorie « bas », 53,8 p.100 à la « moyen » et 44,4 p.100 à la catégorie « élevé » (tab. 4, fig. 5).

TABLEAU 4

Classement des échantillons d'après trois paramètres à la fois : coliformes totaux, coliformes fécaux et staphylocoques à coagulase positive

Dénombrement	A p. 100	B p. 100	C p. 100	D p. 100	E p. 100	F p. 100	Totaux p. 100
Bas	11,1	0	0	0	0	0	1,7
Moyen	61,1	84,2	42,1	66,6	70,0	0	53,8
Elevé	27,7	15,8	57,9	33,3	30,0	100	44,4

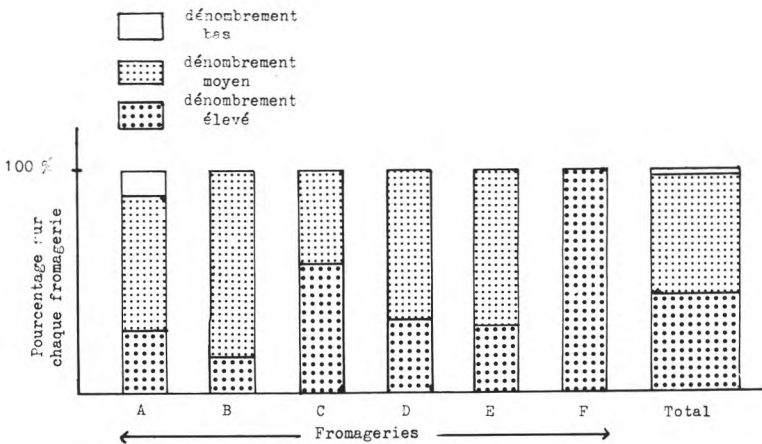


fig. 5

Pourcentage des échantillons de chaque fromagerie selon le niveau de contamination et d'après trois paramètres à la fois : coliformes totaux, coliformes fécaux et *Staphylococcus aureus*.

Histogrammes de fréquence : nous avons reporté sur les figures 6, 7 et 8 les fréquences de contamination des échantillons en fonction, respectivement, du logarithme du nombre le plus probable (log NPP) des coliformes totaux/g ; du log NPP des coliformes fécaux/g et du log du nombre de colonies de staphylocoques à coagulase positive/g.

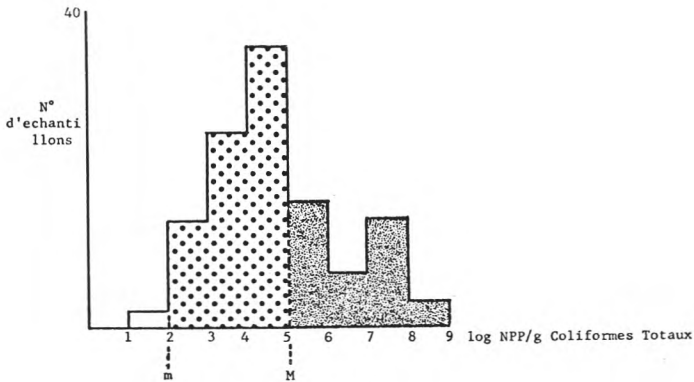


fig. 6

Fréquence de distribution du fromage type « Cuartirolo » en fonction du log NPP/g de coliformes totaux.

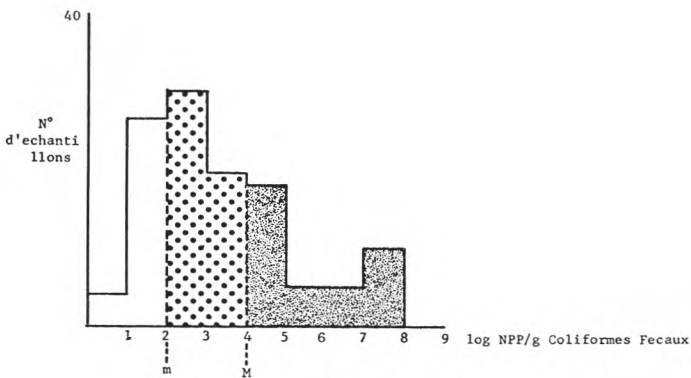


fig. 7

Fréquence de distribution du fromage type « Cuartirolo » en fonction du log NPP/g de coliformes fécaux.

DISCUSSION

Le degré de contamination du fromage par les bactéries coliformes peut être lié aux conditions d'hygiène dans lesquelles s'effectuent la préparation et la manipulation des produits. Leur nombre peut aussi indiquer qu'ils se sont multipliés après la fabrication [7], c'est ce que semble d'ailleurs indiquer la plupart des échantillons examinés, à l'exception de ceux de la fromagerie F, dans lesquels le nombre élevé de coliformes totaux s'accompagnait d'un nombre élevé de coliformes fécaux et de *S. aureus*.

De plus les fromages provenant de cette fromagerie avaient un goût plutôt désagréable et comportaient un grand nombre de trous minuscules, sans doute causés par les coliformes. Nous pensons que dans le cas particulier de la fromagerie F, les conditions d'hygiène pendant la fabrication n'étaient pas satisfaisantes.

Il convient de souligner, qu'à l'exception de ceux de la fromagerie F, la grande majorité des échantillons révélait un degré faible ou même une absence totale de *S. aureus*, ce qui tendrait à prouver que le fromage type « Cuartirolo » fabriqué en Argentine possède une qualité microbiologique convenable.

Les résultats négatifs obtenus dans la recherche des salmonelles viennent renforcer cette idée.

Les résultats de la présente analyse peuvent servir de référence à une étude plus vaste visant à établir des normes microbiologiques

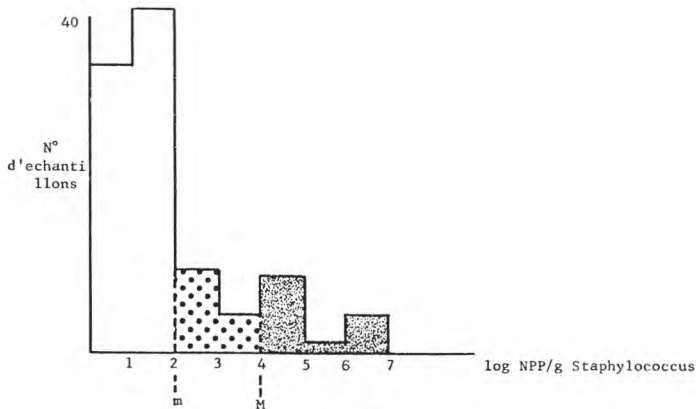


fig. 8

Fréquence de distribution du fromage type « Cuartirolo » en fonction du log NPP/g de *Staphylococcus aureus*.

pour le contrôle des fromages à pâte molle. L'étude devrait être menée par plusieurs laboratoires qui contrôlèrent les échantillons provenant de fromageries connues et judicieusement sélectionnées qui emploieraient les mêmes techniques d'échantillonnage et d'analyse. Il ne faudrait utiliser pour cette étude que des produits obtenus par des procédés de fabrication reconnus comme satisfaisants.

Résumé

Nous avons étudié cent-dix-sept échantillons de fromage type « Cuartirolo argentin », qui provenaient de six fromageries représentatives de la production locale. Notre but a été d'obtenir des renseignements sur le niveau de contamination des fromages à pâte molle et de disposer ainsi de valeurs chiffrées susceptibles d'orienter le choix des critères microbiologiques.

Nous avons préalablement proposé des critères expérimentaux et effectué ensuite le dénombrement des coliformes totaux, des coliformes fécaux, des staphylocoques à coagulase positive et des moisissures et levures ainsi que la recherche des salmonelles.

Selon le résultat des dénombrements, les échantillons ont été répartis en trois groupes : « élevé », « moyen » ou « bas », pour chaque type de micro-organismes.

La plupart des échantillons (65,8 p. 100) présentaient des dénombrements « moyens » en coliformes totaux et des dénombrements « moyens » et « bas » en coliformes fécaux. Tandis que 78 p. 100 des échantillons étudiés ont révélé des taux « bas » de staphylocoques à coagulase positive.

Pour une fromagerie seulement, les échantillons ont été classés dans le groupe « élevé » pour les trois paramètres.

La recherche des salmonelles s'est avérée négative. Les dénombrements de moisissures et levures étaient relativement élevés.

Summary

A study was made of one hundred and seventeen samples of Argentine «Cuartirolo» variety cheeses from six representative brands to obtain information on the degree of microbial contamination of soft cheeses, as well as to collect data which could prove useful for the development of microbiological criteria for control.

Experimental criteria were established prior to laboratory work; total coliforms, fecal coliforms and coagulase-positive *Staphylococcus aureus* were counted. In addition, the search for salmonellae and

mold and yeast counts were also carried out. Samples were grouped according to high, medium and low counts obtained in each of the bacterial groups under study. In most samples, total coliforms showed medium counts. Counts of fecal coliforms were low and medium. Most counts of *Staphylococcus aureus* were low. The samples of only one manufacturer showed high counts in all three parameters. Salmonellae were not isolated from any of the samples examined. Mold and yeast counts were high.

Remerciements

Nous remercions, en premier lieu, les Ing. J.O. Casale et O. Mendizabal (C.I.T.I.L.) pour leur précieuse collaboration pendant la réalisation de ce travail.

Nous remercions également le Dr N. Marchevsky (C.E.P.A.N.Z.O.) 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 janvier, modifié en novembre 1977.

Bibliographie

- [1] Argentina (I.N.T.I.) Centro de Investigaciones Tecnológicas de la Industria Lactea (1973). — Características fisicoquímicas de productos lácteos de consumo en la República Argentina, Buenos Aires.
- [2] Argentina - Ministerio de Bienestar Social (1971). — Código Alimentario Argentino. Decreto n° 111, 12-1-76, Buenos Aires.
- [3] Argentina - Centro de la Industria Lechera (1974-1975). — Memoria, Ejercicio n° 56, Buenos Aires.
- [4] BAIRD PARKER (A. C.) (1969). — The use of Baird Parker's medium for isolation and numeration of *Staphylococcus aureus*. In: Isolation methods for microbiologists, Shapton D.A., Gould G.W. Ed., London, Academic Press, 1-8.
- [5] BLÜMEL (Von B.) (1975). — Unspezifische Lebensmittelvergiftung durch Camembert. Aspekte der mikrobiologischen Untersuchung innerhalb der amtlichen Lebensmittelüberwachung. *Archiv für Lebensmittel Hygiene*, 26, 61-64.
- [6] CICCARELLI (A. S.) and GIMENEZ (D. F.) (1968). — Brote de botulismo en la Prov. de San Luis. *Prensa Univ.*, 250, 42-45.
- [7] FANTASIA (L. D.), MESTRANDREA (L.), SCHRADER (J. P.) and JAGER (J.) (1975). — Detection and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* in soft ripened cheese. *Appl. Micr.*, 29, 179-185.
- [8] FARKHONDEH (A.), GHAZVINIAN (R.) et LACHAL (Ph.) (1974). — Contamination par les *Salmonella* du fromage iranien frais, non salé, mis en vente dans la région de Téhéran. *Le Lait*, 535-536, 302-304.
- [9] GHAZVINIAN (R.), FARKHONDEH (A.), LACHAL (Ph.) et KOHNECHAHRI (M.) (1975). — Dénombrement des germes totaux et détermination du taux de contamination en staphylocoques coagulase positive du fromage iranien frais, non salé, mis en vente dans l'agglomération de Téhéran. *Le Lait* 541-542, 97-99.

- [10] GIOLITTI (G.), CANTONI (C.) (1966). — A medium for the isolation of Staphylococci from Foodstuffs. *J. Appl. Bact.*, 29 (2), 395-398.
- [11] International Commission on Microbiological Specifications for Foods (I.C.M.S.F.) (1974). — Microorganisms in foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications. University of Toronto Press.
- [12] JACQUET (J.) et COIFFIER (O.) (1972). — Sur les coliformes des fromages à pâte molle. Comptes rendus des séances de la Société de Biologie de Caen, 39-43.
- [13] KELLER (P.), SKLAN (D.) and GORDIN (S.) (1974). — Effect of diluent on bacterial counts in milk and dairy products. *J. Dairy Sci.*, 57, 127-128.
- [14] Marché international des produits laitiers (1974). — *Le Lait*, 538, 561-571.
- [15] MARIER (R.), WELLS (J. C.), SWANSON (R. C.) CALLAHAN (W.) and MEHLMAN (I. J.) (1973). — An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* food borne diseases traced to imported French cheese. *Lancet*, 1376-1378.
- [16] MOSSEL (D. A. A.), QUEVEDO (F.). — Control Microbiológico de los Alimentos. Metodos recomendados. Universidad Nacional de San Marcos, Lima, 1967.
- [17] SEBALD (M.), JOUGLARD (J.) et GILLES (G.) (1974). — Botulisme humain type B après ingestion de fromage. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 125 A, 347-349.
- [18] THATCHER (F. S.), CLARK (D. S.) (1973). — Analisis Microbiológico de los Alimentos Zaragoza (España). Editorial Acribia.
-