

## **Influence de faibles concentrations de huit désinfectants sur l'activité d'un levain à Cheddar**

par

P. GELINAS et J. GOULET\*

### **Résumé**

Nous avons évalué les possibilités d'interférence de huit désinfectants sur un levain lactique à cheddar. A la concentration de 5 ppm, le glutaraldéhyde a fortement inhibé le développement d'acidité de la culture lactique. Les produits à base d'ammonium quaternaire, l'acétate de chlorhexidine et l'amphotère se sont montrés moyennement interférants. Les risques d'interférence de l'hypochlorite de sodium, de l'iodophore et de l'acide anionique seraient de faibles à nuls; ces résultats seraient en relation avec la tolérance des désinfectants à la matière organique. Dans les premières heures des essais de simulation de production fromagère, un effet de découplage entre la production d'acidité et la croissance des bactéries lactiques pourrait être causé par la présence de faibles concentrations de désinfectants.

*Mots clés*

Désinfectants - Production fromagère - Levain lactique - Interférence - Découplage.

### **Summary**

EFFECT OF LOW CONCENTRATIONS OF EIGHT DISINFECTANTS  
ON A CHEDDAR CHEESE STARTER

*The possible interference of eight disinfectants on the performance of a cheddar cheese starter was evaluated. At a concentration*

---

\* Département des sciences et technologie des aliments et Centre de recherche en nutrition, Université Laval, Québec G1K 7P4 (Canada).

*of 5ppm, glutaraldehyde strongly inhibited the acidification process. Quaternary ammonium compounds, chlohexidine acetate and the amphoteric surfactant showed an intermediate inhibition pattern. Risks of interference by sodium hypochlorite, iodophor and anionic acid would range from low to none; these results would be in relation with the tolerance of disinfectants to organic matter. An uncoupling effect was observed during the first hours of incubation under a simulated cheese production.*

*Key words*

Disinfectants - Cheese production - Cheese starter - Interference - Uncoupling.

## INTRODUCTION

La présence de traces d'agents d'assainissement et de désinfection sur les équipements utilisés en fromagerie peut affecter l'activité des levains lactiques ajoutés au lait (Pien *et al.*, 1953). Il apparaît donc essentiel de bien connaître les conséquences pratiques de l'application des produits de désinfection utilisés dans ce type d'industrie.

On possède actuellement assez peu d'informations sur les risques potentiels d'interférence des désinfectants sur le pouvoir acidifiant des levains lactiques. Outre les travaux de Kerherve et Richard (1971) et Pearce (1978) qui ont retenu l'attention au cours de la dernière décennie, il faut remonter aux années 50 pour retracer dans la documentation les travaux de quelques chercheurs préoccupés par ce sujet (Miller et Elliker, 1951; Curry et Barber, 1952; Babel, 1954; Speck *et al.*, 1955; Wilkowske et Kriemke, 1955). Il ressort de ces études que les composés d'ammonium quaternaires présentent des risques d'interférence élevés comparativement aux agents chlorés communément utilisés en milieu industriel. Cependant, aucune étude ne s'est intéressée à une gamme vraiment élargie de désinfectants d'usage commercial et à leur classification en fonction de leur potentiel interférant. Dans le cadre d'expériences de simulation de production fromagère, nous avons vérifié l'action de huit produits de désinfection sur un levain commercial à cheddar.

## MATERIEL ET METHODE

### Produits de désinfection

Les produits suivants ont été évalués :

- Acide anionique (Per-Vad de BASF Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich., E.U.) :
  - acide orthophosphorique 15 % ;
  - sel de sodium d'acide oléique sulfoné 2,6 % (matière active) ;
  - pH 1.

- Acétate de chlorhexidine (Hibitane de Ayerst, McKenna et Harrison Ltée, Montréal, Québec, Canada) :  
1,6-di (4-chlorophenyl diguanido) hexane 1,6 % (matière active) ;  
pH 6,4.
- Composé d'ammonium quaternaire (de Lonza Chemicals, Fair Lawn, N.J., E.U.) :  
chlorhydrate de N-alkyl diméthyl benzyl ammonium (40 % C<sub>12</sub> ;  
50 % C<sub>14</sub> ; 10 % C<sub>16</sub>) ; 13,5 % (matière active) ;  
pH 9,5.
- Glutaraldéhyde (de Union Carbide Corp., New York, N.Y., E.U.) :  
1-5 pentanedial 50 % (matière active) ;  
pH 2,8.
- Hypochlorite de sodium (Javex 12 de Bristol-Myers, Toronto, Ontario, Canada) :  
environ 10 % (matière active) ;  
pH 12,1.
- Iodophore (Iodor d'Ecochimie Ltée, Longueuil, Québec, Canada) :  
acide phosphorique 3 % ;  
bloc de co-polymère d'oxyde d'éthylène-oxyde de propylène 12 % ;  
iode actif 2 % (matière active) ;  
pH 1,5.
- Complexe aldoquaternaire (Quatal d'Ecochimie Ltée, Longueuil, Québec, Canada) :  
chlorhydrate de N-alkyl diméthyl benzyl ammonium (40 % C<sub>12</sub> ;  
50 % C<sub>14</sub> ; 10 % C<sub>16</sub>) 10,5 % (matière active) ;  
glutaraldéhyde 5,5 % (matière active) ;  
pH 4,5.
- Amphotère (Tego 51 de Goldschmidt, Essen, Allemagne) :  
chlorhydrate de dodecyl di-(aminoéthyl)-glycine ;  
10 % (matière active) ;  
pH 7,7.

Chaque produit était préparé de telle sorte qu'un ajout de 10 ml donnait des concentrations de 5, 10 et 25 ppm de matière active. Pour quelques composés, des valeurs de 50, 70 et 75 ppm ont aussi été évaluées.

### Protocole expérimental

Tous les essais ont été effectués à partir d'une poudre de lait entier (Coop. Laitière de la Côte Sud, St-Alexandre, Québec) réhydratée puis stérilisée (121° C - 15 min). Pour l'évaluation de chaque solution de bactéricide, 1 litre de lait était chambré à 30° C pendant au moins 1 h avant d'effectuer les essais. Au temps zéro, 10 ml de la solution bactéricide étaient ajoutés (sous agitation) ; 1 min plus tard, on inoculait le lait avec 15 ml d'un levain lactique à Cheddar (C19) obtenu de l'Institut de technologie agricole et alimentaire

de Saint-Hyacinthe (Québec). Le levain était composé d'un mélange de *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* et *Streptococcus diacetylactis* incubé pendant 18 h à 22° C dans un milieu de lait écrémé réhydraté à 12 % de solides totaux et préalablement chauffé à 85° C pendant 30 min. Le taux d'inoculation était de 1 % (v/v). Immédiatement après l'addition du levain, le lait était mélangé; l'incubation se déroulait ensuite en absence d'agitation. Des mesures d'acidité titrable étaient prises à toutes les heures et rapportées en degrés Dornic (1° D = 0,01 % ac. lactique).

## RESULTATS ET DISCUSSION

### Potentiel interférant

Les figures 1 à 8 permettent de comparer le niveau d'interférence de chacun des produits avec celui du témoin. Les valeurs obtenues ont été corrigées en tenant compte de l'effet de l'addition du bactéricide. Une augmentation d'acidité titrable de 1 degré Dornic (° C) était causée par des ajouts de 10 et 25 ppm de glutaraldéhyde, de 5 et 10 ppm d'iodophore et de 5, 10 et 25 ppm d'acétate de chlorhexidine. Pour une solution de 25 ppm d'aldoquatenaire ou d'iodophore, une augmentation de 2° D était observée alors que pour l'acide anionique, on notait une différence de 7° D (50 ppm) et de 9° D (75 ppm).

Au tableau 1, on trouve une classification des produits testés en fonction de leur potentiel interférant. Celle-ci tient compte de la dilution d'emploi recommandée par le manufacturier et nous permet d'évaluer les risques d'interférence des bactéricides avec l'activité du levain lactique. Nous avons opté pour une valeur de 1 % de cette dernière concentration, ce qui représente une valeur maximale susceptible de se trouver dans le lait lors de la production fromagère. A titre d'exemple, prenons le cas du composé d'ammonium quaternaire qui doit théoriquement être utilisé à 200 ppm de matière active. Selon notre barème (1 % de la dilution d'emploi), ce composé risquerait de se retrouver à une concentration de l'ordre de 2 ppm dans le milieu. Le rapport entre la concentration trouvée interférante (10 ppm) représentant un développement d'acidité de 20 % inférieur à celui du témoin après 7 h, et notre barème (2 ppm), nous donne une valeur arbitraire des possibilités d'interférence du produit, soit 5. Plus cette dernière valeur sera faible, plus mince deviendra la marge de sécurité offerte lors de l'emploi des produits de désinfection.

Selon les résultats obtenus, on trouve une valeur relativement faible pour le glutaraldéhyde (0,1) indiquant une grande possibilité d'interférence. Pour l'aldoquatenaire, l'ammonium quaternaire, l'acétate de chlorhexidine et l'amphotère, la marge de sécurité varie de 3 à 8 environ. Les chances d'observer une interférence seraient

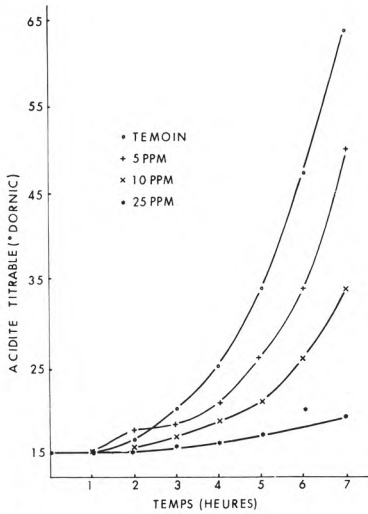


Fig. 1

Interférence du glutaraldéhyde en production fromagère simulée.

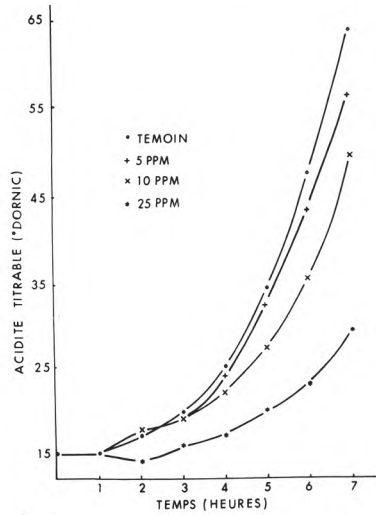


Fig. 2

Interférence du complexe aldoquaternaire en production fromagère simulée.

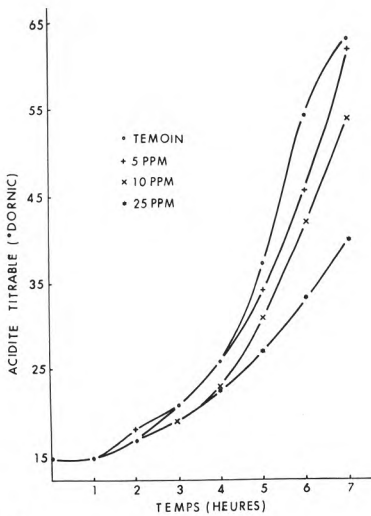


Fig. 3

Interférence du composé d'ammonium quaternaire en production fromagère simulée.

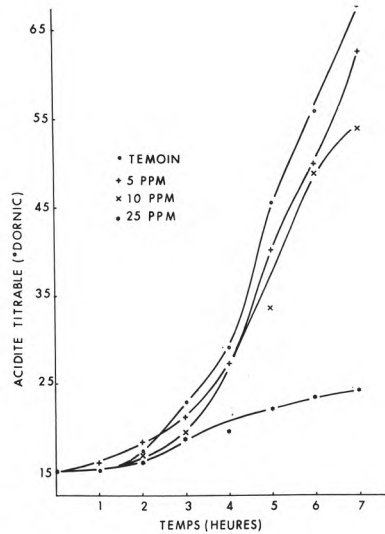


Fig. 4

Interférence de l'acétate de chlorhexidine en production fromagère simulée.

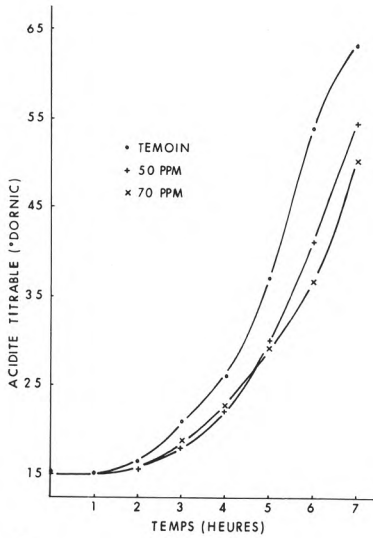


Fig. 5

Interférence de l'amphotère en production fromagère simulée.

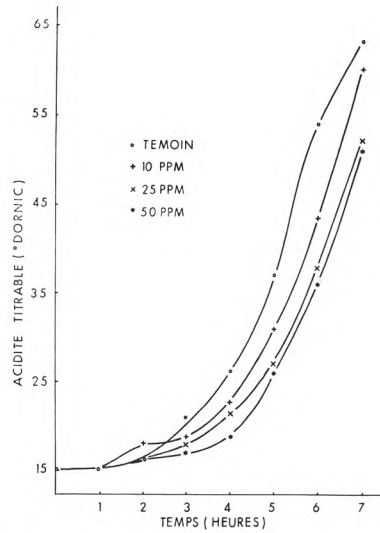


Fig. 6

Interférence de l'hypochlorite de sodium en production fromagère simulée.

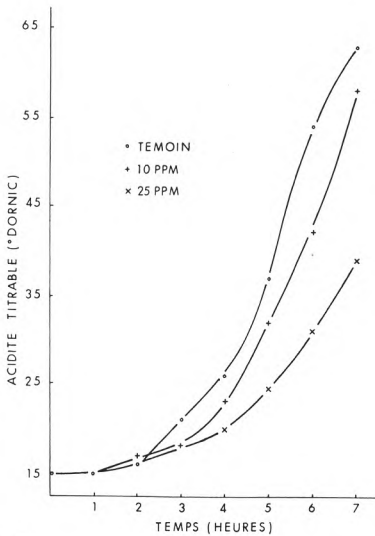


Fig. 7

Interférence de l'iodophore en production fromagère simulée.

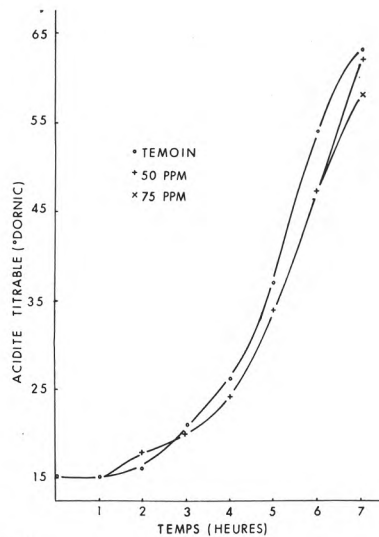


Fig. 8

Interférence de l'acide anionique en production fromagère simulée.

TABLEAU 1 - TABLE 1

Risque d'interférence de 8 produits de désinfection avec le pouvoir acidifiant d'un levain lactique

*Risk of disinfectant interference with the acidifying capacity of a cheese starter*

Risque d'interférence	Agent (1 % de la dilution d'emploi recommandée par le manufacturier)	Concentration interférente (développement d'acidité de 20 % inférieur à celui du témoin)	Rapport entre la concentration interférente et 1 % de la dilution d'emploi
Elevé	Glutaraldéhyde (env. 50)	5	0,1
	Complexe aldoquaternaire (1,6)	5-10	3-6
Moyen	Composé d'ammonium quaternaire (2)	10	5
	Acétate de chlorhexidine (6,25)	25-50	4,8
	Amphotère (10)	70	7
	Hypochlorite de sodium (2)	50	25
Faible	Iodophore (0,25)	10-25	40-100
	Acide anionique (2)	> 75	> 40

donc moyennes mais nettement plus élevées que pour l'hypochlorite, l'iodophore et l'acide anionique qui présentent des valeurs supérieures ou égales à 25.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus correspondent bien à ceux rapportés par Kerherve et Richard (1971) si l'on considère comme barème d'interférence un développement d'acidité de 20 % inférieur à celui du témoin. Nous avons observé en effet, un retard d'environ 1 h dans les courbes d'acidification du lait, ce qui est considéré comme significatif et susceptible d'avoir des conséquences économiques importantes en fabrication fromagère (Miller et Elliker, 1951). L'emploi d'autres barèmes de même que l'utilisation de protocoles expérimentaux différents du nôtre (Pien *et al.*, 1953) ou encore mal détaillés (Babel, 1954) rendent difficile la comparaison des résultats. A l'instar de Kerherve et Richard (1971), nous croyons que l'emploi de délais fixes (les plus courts possibles), entre l'addition du désin

fectant et celle du ferment, est de nature à normaliser ce type d'essais.

Whitmore et Miner (1976) signalent que la neutralisation des produits de désinfection est fonction du type de désinfectant et du temps de contact. Il faudrait donc veiller à débiter les essais d'acidification immédiatement après s'être assuré du mélange parfait du lait avec la solution bactéricide ; nous l'avons fixé à 1 min pour nos essais.

D'autre part, nous suggérons l'emploi de poudres de lait d'un même lot, de solutions fraîches de bactéricides ainsi que des levains non réfrigérés. Parmi les autres facteurs susceptibles de fausser les résultats obtenus, il faudrait porter une attention particulière au volume des récipients employés lors des essais. Mackrell et Walker (1978) ont mentionné la très grande importance des phénomènes d'adsorption de produits comme les composés d'ammonium quaternaire sur les parois des récipients employés dans le cadre d'essais sur les produits de désinfection. Il demeure possible que l'emploi de contenants de natures et de volumes différents puisse contribuer à adsorber plus ou moins les produits de désinfection.

### Effet de découplage

En observant attentivement le comportement des courbes d'acidification (fig. 1 à 8) au début de la période d'incubation (0 à 3 h), on remarque un effet de stimulation de la production d'acidité titrable. Ce phénomène est observé pour les plus faibles concentrations de produits de désinfection susceptibles d'interférer avec l'acidification du milieu. Cet étrange comportement n'est pas observé chez les témoins et il est plus particulièrement évident pour l'hypochlorite de sodium (10 ppm), le glutaraldéhyde (5 ppm), l'acide anionique (50 et 75 ppm), le complexe aldoquaternaire (5 ppm), le composé d'ammonium quaternaire (5 ppm), l'acétate de chlorhexidine (5 ppm) et l'iodophore (10 ppm). Ce phénomène n'a cependant pas été observé pour l'amphotère et s'atténue toutefois après 2 à 3 h d'incubation pour donner lieu à un ralentissement du pouvoir acidifiant de la culture lactique.

Parmi les hypothèses pouvant expliquer ce comportement, Lamanna *et al.* (1973) mentionnent que des traces d'agents bactéricides peuvent stimuler des cellules bactériennes. Même s'il est possible que ce phénomène ne s'applique pas pour tous les agents, la présence de faibles concentrations de bactéricides pourrait exercer un effet stimulant sur la cellule. Par exemple, un changement dans la perméabilité de la membrane permettrait un plus grand échange avec le milieu provoquant aussi une activité métabolique accrue. Nous suggérons donc l'hypothèse d'un découplage entre la croissance et le pouvoir acidifiant de la culture lactique. Turner et Thomas

(1975) ont pu stimuler le pouvoir acidifiant de diverses souches lactiques en leur appliquant un léger stress de température (Franks *et al.* 1980). Nous croyons que la présence à un niveau sous-létal de résidus de produits de désinfection dans le milieu de croissance pourrait fournir un stress analogue. Cet effet ne semble pas avoir de conséquences néfastes sur la croissance des cellules puisque la culture n'accuse, par la suite, qu'un léger retard par rapport au témoin. Cet effet de stimulation n'apparaissant qu'après 1 h d'incubation environ, nous pouvons conclure à l'intervention d'un système de régulation intracellulaire. Un temps équivalent à quelques générations pourrait suffire aux micro-organismes pour s'adapter à des changements environnementaux, ce qui leur permettrait de mettre sur pied un nouveau système de régulation mieux adapté aux nouvelles conditions.

Selon nos résultats, il semble que de faibles concentrations de solutions bactéricides aient réussi à déclencher un mécanisme d'ajustement tandis que les concentrations plus élevées ne viennent qu'allonger la période de latence en inhibant plus ou moins fortement le pouvoir acidifiant de la culture lactique. Cette dernière étant composée de trois souches bactériennes, il est possible que certaines aient été plus affectées que d'autres. Ce phénomène de découplage prend fin après 3 h, soit à peu près au moment où débute véritablement le développement d'acidité du témoin. Ce n'est qu'après cette période de temps que le pouvoir interférant des produits de désinfection peut être observé.

Selon les observations de Whitmore et Miner (1976) ainsi que de Hekmati et Bradley (1979), la majeure partie de la solution bactéricide présente dans un milieu contenant de la matière organique est neutralisée en moins d'une heure. Cette neutralisation se poursuit de façon régulière (Hekmati et Bradley, 1979) et est fonction du temps ainsi que du type de désinfectant. Après ce moment, nous croyons que l'inhibition de la culture lactique est reliée à la tolérance à la matière organique de chacun des produits de désinfection (Gélinas et Goulet, 1982).

Babel (1954) a pour sa part signalé que de faibles quantités de bactéricides stimulaient la production d'acide. Cependant Miller et Elliker (1951) de même que Curry et Barber (1952) n'ont pas observé un tel phénomène avec de faibles concentrations (5-10 ppm) d'un composé d'ammonium quaternaire. Wilkowske et Kriemke (1955) n'ont pas non plus signalé d'effet stimulant sur la production d'acide avec l'hypochlorite de sodium (1 ppm). Toutefois, ces derniers ne présentent des valeurs d'acidité qu'à toutes les 4 h alors que le phénomène que nous rapportons dure moins de 2 h et se produit au début des essais. Il est aussi possible que le protocole expérimental lui-même ait influencé les résultats puisque le délai entre l'addition des désinfectants dans le lait et celle du levain est important.

Le phénomène de stimulation observé dans le cadre de nos essais pourrait fournir des explications concernant certaines variations parfois rencontrées lors de l'acidification au début de la production fromagère. Ce phénomène ne devrait cependant pas exercer d'influence négative majeure sur l'ensemble de la production fromagère. Les résultats obtenus nous permettent de classer les produits de désinfection selon leur potentiel interférant en production fromagère. Kerherve et Richard (1971) considèrent le composé d'ammonium quaternaire comme un produit à éviter en fromagerie alors que l'amphotère, l'hypochlorite de sodium et l'iodophore ne sont pas jugés interférants. Il nous apparaît plus judicieux de classer les produits de désinfection selon leur potentiel interférant. Même si des essais plus poussés dans la pratique apparaissent nécessaires, il semble que l'observation d'un facteur de sécurité inférieur à 10 (tab. 1) est de nature à soulever certaines craintes. Les produits jugés les plus interférants sont donc dans l'ordre : le glutaraldéhyde, le complexe aldoquaternaire, le composé d'ammonium quaternaire, l'acétate de chlorhexidine et l'amphotère. Seuls l'hypochlorite de sodium, l'iodophore et l'acide anionique ne risqueraient pas de causer de problèmes dans des conditions d'usage non abusif.

Il convient de signaler enfin que ces résultats sont en concordance avec des observations faites sur la tolérance des agents de désinfection vis-à-vis de la matière organique : les produits jugés les plus efficaces en présence de matière organique sont les plus interférants en production fromagère (Miner *et al.*, 1975 ; Gélinas et Goulet, 1982). Cependant, la confirmation des résultats obtenus avec d'autres types de levains lactiques (Pearce, 1979) semble indiquée.

*Reçu pour publication en mai 1982.*

## Remerciements

*Nous remercions sincèrement Thérèse Duval pour son assistance technique et Carole Noël pour ses judicieux conseils lors de la rédaction de cet article. Ce travail a été effectué dans le cadre d'un contrat de recherche (ISZ79-00260) accordé par Agriculture Canada à Ecochimie Ltée de Longueuil, Québec.*

## Bibliographie

- BABEL (F.J.) (1954). — Changes in the bacterial population of milk due to the addition of some chemical bactericides. *J. Dairy Sci.*, 37, 635-636.
- CURRY (J.C.) and BARBER (F.W.) (1951). — «Inhibition» of *Streptococcus lactis* by a quaternary ammonium compound in cheese milks. *J. Milk Food Technol.*, 15, 278-281, 299.
- FRANKS (P.A.), HALL (R.J.) and LINKLATER (P.M.) (1980). — Mechanistic model of the growth of *Streptococcus cremoris* HP at superoptimal temperature. *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1465-1487.

- GÉLINAS (P.) and GOULET (J.) (1982). — Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. *J. Appl. Bacteriol.*, 52 (accepté pour publication).
- HEKMATI (M.) and BRADLEY (R. L.) (1979). — Effect of milk constituents on the persistence of sodium hypochlorite sanitizer. *J. Dairy Sci.*, 62, 47-48.
- KERHERVE (L.) et RICHARD (J.) (1971). — Influence des résidus de désinfectants dans le lait sur l'activité de quelques Streptocoques lactiques. *Revue Laitière Française*, 291, 717-722.
- LAMANNA (C.), MALETTE (M. F.) and ZIMMERMAN (L. N.) (1973). — Basic bacteriology, 4<sup>e</sup> ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 1024-1066.
- MACKRELL (J. A.) and WALKER (J. R. L.) (1978). — The biodegradation of quaternary ammonium compounds. *Int. Biodeterior. Bull.*, 14, 77-83.
- MILLER (D. D.) and ELLIKER (P. R.) (1951). — Effect of quaternary ammonium compounds on activity of lactic acid starter in milk and cheese. *J. Dairy Sci.*, 34, 279-286.
- MINER (N. A.), WHITMORE (E.) and McBEE (M. L.) (1975). — A quantitative organic «soil» neutralization test for disinfectants. *Dev. Industr. Microbiol.*, 16, 23-30.
- PEARCE (L. E.) (1978). — Quaternary ammonium detergent sanitizers and starter activity. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 13, 56-58.
- PIEN (J.), LIGNAC (J.) et CLAUDE (P.) (1953). — Détection biologique des antiseptiques et des antibiotiques dans le lait. *Le Lait*, 33, 369-386.
- SPECK (M. L.), MURLEY (W. R.), LUCAS (H. L.) and AURAND (L. W.) (1955). — Evaluation of a detergent-sanitizer for use on producer milking utensils. *J. Milk Food Technol.*, 18, 71-76.
- TURNER (K. W.) and THOMAS (T. D.) (1975). — Uncoupling of growth and acid production in lactis streptococci. *N.Z. J. Dairy Sci. Technol.*, 10, 162-165.
- WHITMORE (E. J.) and MINER (N. A.) (1976). — Analysis and optimization of a quantitative organic soil neutralization test for disinfectants. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 59, 1344-1351.
- WILKOWSKE (H. H.) and KRIEMKE (W. A.) (1955). — Inhibitory substances in milk. *J. Milk Food Technol.*, 18, 254-261.
-