



# Quels sont les bénéfices et risques des bactéries à Gram négatif sur la **sécurité sanitaire des fromages** ?

C. Delbès-Paus, Miszczycha S., Ganet S., Pochet S., Helinck S., Thévenot D., Irlinger F., et MC. Montel



# CONTEXTE

---



Des connaissances antérieures et acquises dans le projet GRAMME sur les bactéries à Gram négatif...

- **Des facteurs de risques *in vitro*** chez certaines espèces: potentiel de production d'amines biogènes
- **Des espèces pathogènes** : *Salmonella*, *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC)

...des interrogations sur le risque associé aux bactéries à Gram négatif **en fromage**

- *Enterobacteriaceae* : **production d'amines biogènes** en fromage ?
- Comportement des STEC en fromage en présence de **communautés microbiennes complexes** ?
- **Effet barrière potentiel de bactéries à Gram négatif** vis-à-vis de pathogènes ?

# OBJECTIF

---



Evaluation de l'impact et des potentialités des bactéries à Gram négatif **en fromage** sur:

- **Production d'amines biogènes (-)**
- **Effet barrière (+) sur le développement des STEC**

## Démarche

- **20 souches Gram- sélectionnées** sur la base des résultats *in vitro* (biodiversité, antibiorésistance, production d'amines biogènes *in vitro*)
- Inoculation dans **deux fromages modèles** (pâte pressée non cuite, pâte molle)
- En présence d'un **consortium microbien complexe**

# MÉTHODOLOGIE



## Co-inoculations du consortium microbien, de bactéries Gram- et de *E. coli* STEC, en fromage

*Consortium*  
microbien complexe  
8 bactéries  
2 levures

+/- Bactéries à Gram  
négatif  
 $10^2 - 10^6$  UFC/ml

+/- *E. coli* (STEC)  
 $10^2$  UFC/ml

Ensemencement en lait pasteurisé (fromage modèle PPNC)  
ou en caillé au lait pasteurisé (fromage modèle PMCL)

Fromages modèles  
Affinage 28 jours (PPNC)  
35 jours (PMCL)

**Dynamique des populations**  
**Production d'amines biogènes**  
**Croissance des STEC**

# Rappel sur l'implantation des Gram- en fromage

---



## « Cœur » modèle fromage PPNC

- Fort pouvoir colonisateur de ***H. alvei***=***K. oxytoca***=***C. freundii*** =***P. vulgaris*** ( $10^6$ UFC à 28J )
- Décroissance ***Halomonas venusta***, ***Morganella morganii*** en fin d'affinage

## « Surface » modèle fromage PMCL

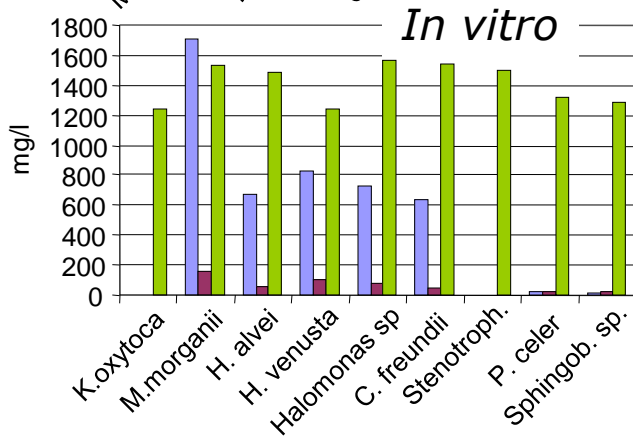
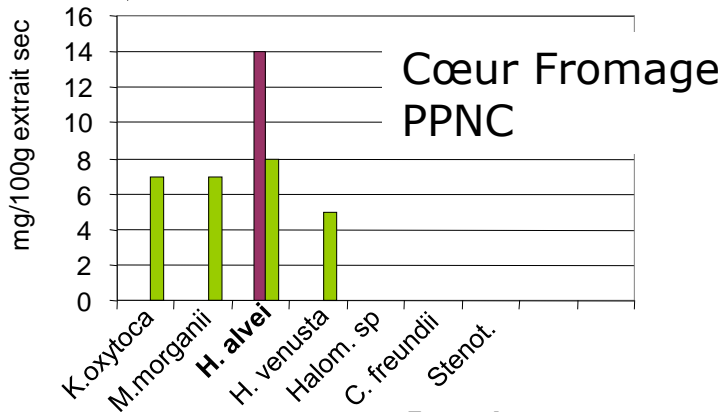
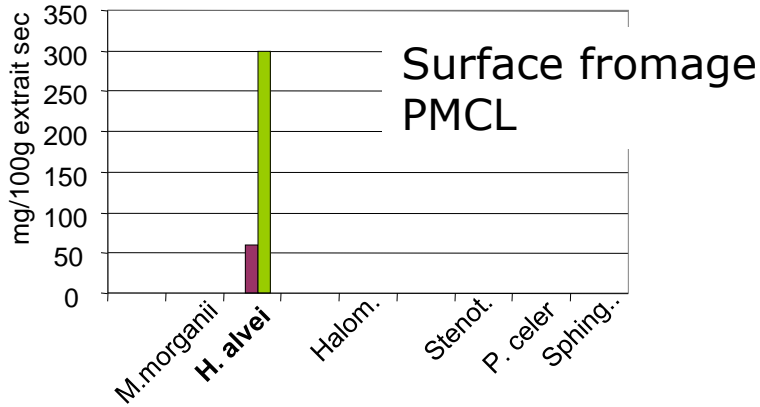
- Dominance de ***Stenotrophomonas maltophilia*** en début d'affinage
- Développement de ***Psychrobacter celer***, ***H. alvei*** et ***A. faecalis*** au cours des 35 jours d'affinage.



---

# **Production d'amines biogènes par les bactéries à Gram négatif dans les fromages**

# Comparaison *in vitro* et en fromages



☞ **Uniquement cadavérine et putrescine** produites à cœur et en surface de fromage

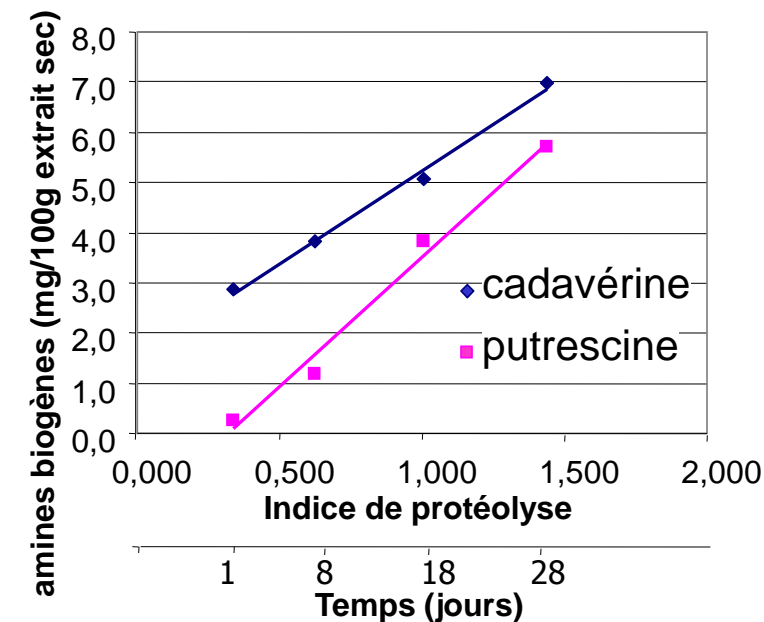
☞ Production d'amines biogènes en fromage **limitée qualitativement et quantitativement** par rapport à celle mesurée en milieu de laboratoire

■ Histamine

■ Putrescine

■ Cadavérine

# Relation entre concentrations en acides aminés libres et amines biogènes



Relation quasi linéaire entre l'indice de protéolyse (estimateur de la **teneur en acides aminés libres**) et les concentrations de putrescine et cadavérine dans les fromages

Pas d'histamine produite: absence des acides aminés précurseurs spécifiques de l'histamine ??

La production d'amines biogènes en fromage dépendrait de **la concentration et de la nature des acides aminés libres**



## ➤ **Putrescine et/ou cadavérine**

➤ produites en **quantités faibles** par rapport aux quantités rencontrées occasionnellement dans des fromages à pâte pressée (jusqu'à 600 mg/kg).

➤ **effets physiologiques directs mineurs** / histamine et tyramine mais peuvent potentialiser les effets de ces amines

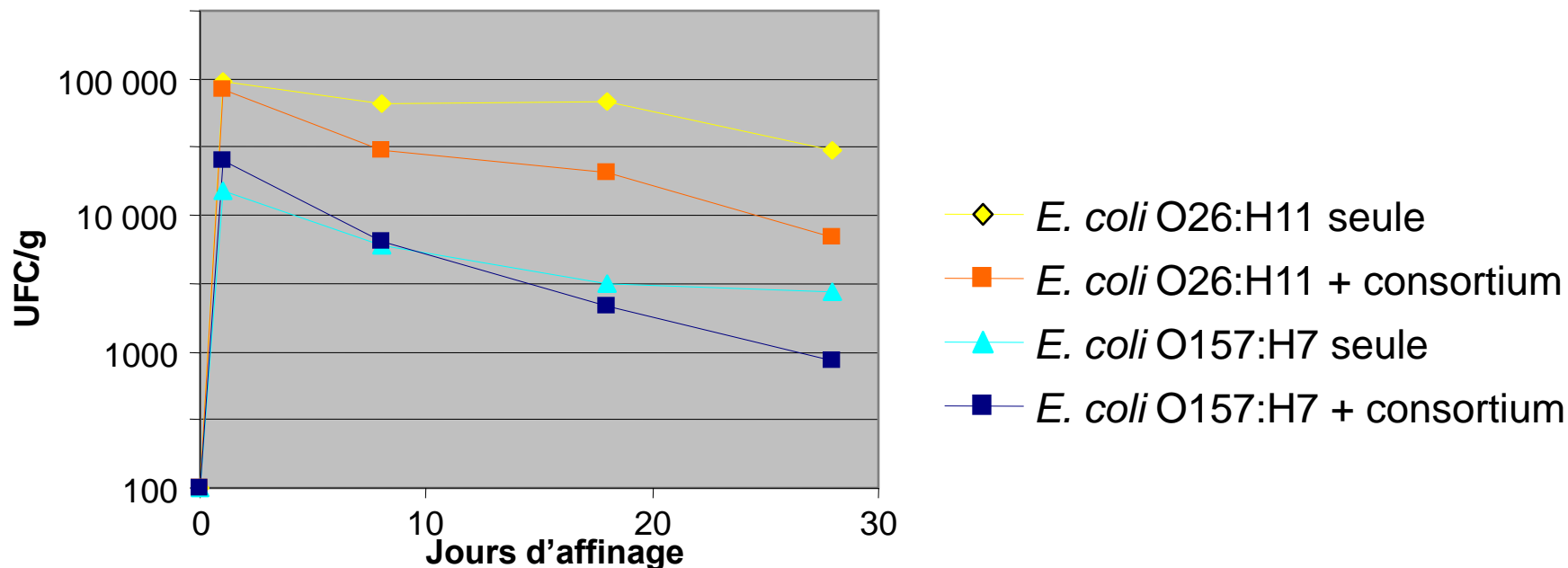
↪ **Risque faible pour la santé humaine** associé à la production d'amines biogènes par les souches Gram- dans la pâte du fromage modèle



---

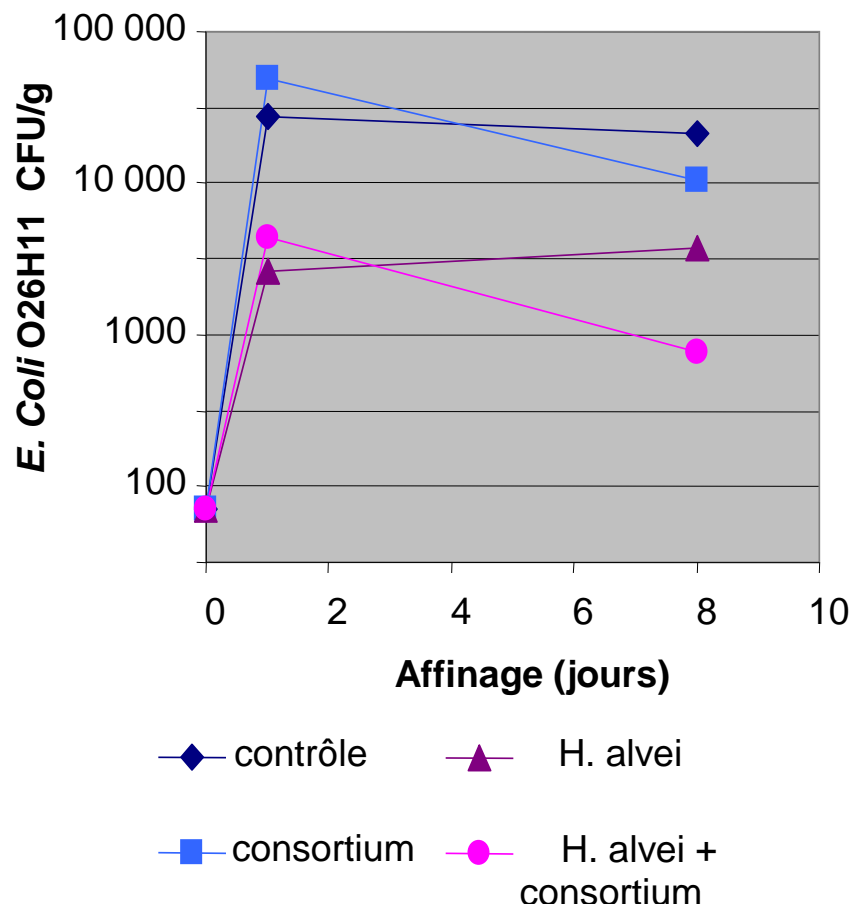
# **Effet barrière de consortia microbiens sur le développement des *E. coli* STEC dans la pâte du fromage modèle PPNC**

# Niveaux de STEC dans le fromage PPNC en présence ou absence du consortium



- **Croissance importante le 1er jour** pour les deux souches d'*E. coli* STEC
- Réduction des niveaux des STEC durant l'affinage, **plus importante en présence du consortium microbien**
- Niveaux de *E. coli* O26:H11 (souche L23A) supérieurs à ceux de la souche O157:H7 à tous les temps

# Effet barrière des consortia et de *Hafnia alvei* vis à vis de *E. coli* O26:H11

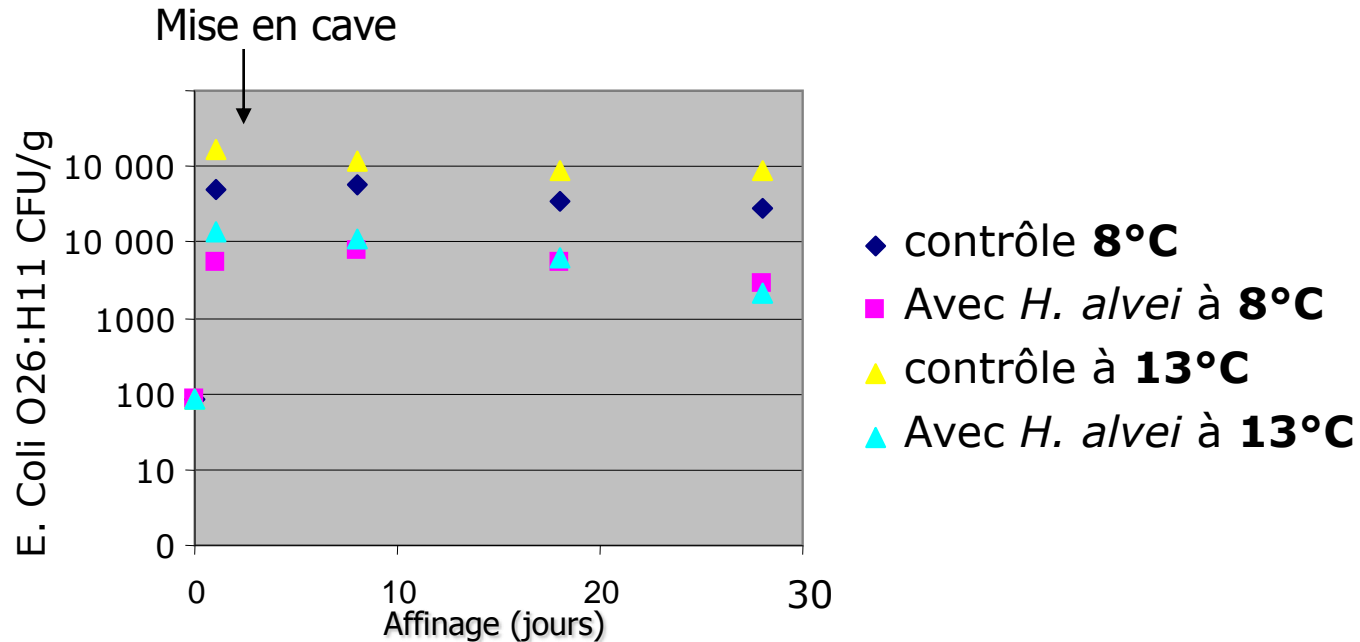


✓ **A 1 jour: Inhibition de la croissance de *E. coli* O26:H11 (souche L23A) en présence de *H. alvei***

✓ **Après 8 jours: Synergie potentielle entre *H. alvei* et le consortium** pour la réduction du niveau de *E. coli* souche L23A au cours de l'affinage

☞ **Potentialités inhibitrices de *H. alvei* vis-à-vis de *E. coli* O26:H11**

# Effet de la température d'affinage sur les niveaux de *E. coli* O26:H11



↪ **Aucune différence significative** de survie de *E. coli* O26:H11 souche L23A entre les températures d'affinage testées (8°C et 13°C)

# Conclusions et perspectives sur l'étude des STEC

---



- ✓ **Potentiel antagoniste de *H. alvei*** sur la souche L23A de *E. coli* O26H11 en présence du consortium technologique dans la pâte du fromage.
- ✓ Nécessite un **taux d'inoculation de *H. alvei* élevé** (6 log)
- ✓ Inhibition pas associée à une production importante d'acides organiques

Travaux en cours ou envisagés sur:

- Rôle potentiel du peroxyde d'hydrogène dans l'inhibition de souches de STEC par *Hafnia alvei*
- Validation de l'inhibition de STEC par *H. alvei* **en fromage au lait cru**, en considérant l'impact potentiel de *H. alvei* sur les **qualités sensorielles**

# Conclusions générales sur le projet GRAMME



## ➔ Evaluation des bénéfices et des risques associés aux bactéries Gram- :

### Risques

☹ Risque faible de production d'amines biogènes dans les fromages modèles même par les souches productrices *in vitro*

☹ Des souches résistantes aux antibiotiques peuvent atteindre des niveaux élevés en fromage



### Bénéfices

☺ Effet barrière potentiel des bactéries Gram- vis-à-vis de *E. coli* STEC

☺ Participation des Gram- à la production de composés aromatiques en surface modèle fromages

☺ Effet sur les caractéristiques sensorielles des fromages

# Points de discussion

---



Ces résultats du projet GRAMME montrent la diversité des bactéries à Gram négatif et des bénéfiques/risques associés.

↳ Nécessité de **gérer l'équilibre** entre **espèces « banales »**, neutres ou potentiellement bénéfiques, et **espèces ou souches présentant un risque sanitaire vérifié**.

↳ Quels **réservoirs ou « foyers »** de bactéries à Gram négatif dans les élevages et l'environnement de fromagerie ?