

*Rédaction :
Pierre PARGUEL
Institut de l'Elevage*

Connaître et maîtriser les flores microbiennes pour des fromages « typiques »

Synthèse des échanges techniciens d'élevage et chercheurs à Laguiole 14-16 mai 2008

Le contexte

Le réseau inter-flores a été mis en place suite aux rencontres sur l'AOC à Pontarlier en 2000. Lors de ces journées, Rémy GRAPIN (INRA) et Gustave PERNODET (ENIL) ont apporté leur soutien à une réflexion sur les laits crus, depuis l'étude de l'incidence des pratiques d'élevage sur la flore des laits, jusqu'à la mise en place d'actions de conseil en élevage. Par la suite, c'est sous l'égide du CIGC qu'ont été convoquées les premières réunions auxquelles participaient le GIS Alpes du Nord, l'INRA, le CTC et l'Institut de l'Elevage. Au fil du temps ont rejoint ce groupe informel des personnes venant des organismes suivants : INRA d'Aurillac et Corte, Centre Fromager de Carmejeane, Université de Caen, pôle AOC Massif Central, EI de Purpan, ISARA-Lyon, GIS ID 64...

Ce groupe organise tous les deux ans des rencontres entre chercheurs et techniciens pour partager les derniers résultats de la recherche sur les écosystèmes microbiens en fromagerie et pour étudier les applications de ces résultats dans les filières fromagères.

C'est ainsi qu'environ soixante chercheurs et techniciens venant de toutes les régions de France se sont retrouvés pour des échanges techniques à Laguiole.

Au cours de ces journées ont été traités successivement les thèmes suivants :

- le point sur les recherches concernant la connaissance des écosystèmes microbiens,
- une synthèse sur l'effet protecteur des écosystèmes microbiens,
- les indicateurs de la qualité microbienne des laits,
- la caractérisation et la maîtrise des flores permettant l'expression de caractéristiques originales des fromages.

Cette note a pour objet de consigner et de rendre disponibles au maximum de personnes les principales informations et idées issues des apports et réflexions de ces journées.

1 – Mesurer les écosystèmes microbiens des laits et des fromages

La recherche et le développement ont besoin d'outils de mesure des caractéristiques microbiologiques. Ces outils couvrent des besoins variés depuis la qualification d'un lait ou d'un fromage pour piloter un processus technologique, jusqu'à des mesures fines permettant de comprendre un mécanisme microbien. Voici un synthèse de l'état de l'art en la matière :

Identifier « tout ce qui pousse » sur un milieu non sélectif

Cette approche est utilisée par les équipes travaillant sur la santé (équipe du CHU de Besançon, travaillant sur les allergies en lien avec les ambiances des fermes en Franche Comté). Les germes présents dans l'échantillon sont mis en culture sur un milieu non sélectif et l'identification des souches est réalisée à partir des colonies identifiées par leur aspect sur le milieu de culture. Les difficultés de mise en œuvre (et les coûts) limitent les repérages au niveau des souches. Mais cette approche a permis d'enrichir le travail fait en ferme à Comté pour comprendre les transferts par l'ambiance.

Utiliser la sélectivité des milieux de culture

Des milieux de culture spécifiques permettent de distinguer des groupes de flores par rapport à leurs fonctionnalités (exemple : les bactéries lactiques). La capitalisation de nombreux travaux de recherche a permis de recenser les germes poussant sur différents milieux. Ainsi, la « sélectivité » des milieux de culture pourrait être utilisée pour apprécier les composantes d'une flore. Un travail de formalisation est en cours au sein du groupe inter-flores. Un catalogue des milieux disponibles et de leurs caractéristiques permettra de faciliter la mise en place des protocoles analytiques à des fins de recherche ou de pilotage des processus.

Etablir un indice de la part respective des groupes en fonction de leurs rôles

Une étude sur le Laguiole (ACTILAIT – Pôle AOC MC) propose une approche novatrice. Dans un premier temps, une réflexion par rapport au produit pose des hypothèses sur les groupes de flores ayant un effet sur la technologie et sur le produit. Ces groupes de flores sont mesurés en utilisant la sélectivité des milieux de culture. Un indice est établi à partir du pourcentage de chaque groupe de flores. Bien que la quantité de micro-organismes soit mesurée, cette approche privilégie le rapport entre les groupes de flores. Il s'agit bien d'un « indice » (et non d'un pourcentage) car un même germe peut être repéré dans plusieurs systèmes sélectifs (plusieurs milieux de culture). L'indice ainsi établi se veut une image de l'équilibre des « fonctionnalités » (positives ou négatives) des flores présentes.

Il est envisagé, qu'à terme, ce calcul d'indice soit affiné en tenant compte de la quantité des germes présents dans l'échantillon étudié.

L'approche moléculaire pour identifier les espèces et/ou souches

Il est possible d'approcher la flore par des mesures plus fines. Certaines techniques s'appuient sur des prélèvements de mélanges d'ADN directement depuis l'échantillon. Ces techniques permettent d'identifier les souches dominantes, voire d'avoir une appréciation des niveaux de population et des équilibres entre les différentes espèces, voire même de discriminer des sous populations. C'est une des méthodes utilisée pour l'étude des lactobacilles hétérofermentaires en Comté

Au niveau de la recherche, les combinaisons de ces différentes techniques permettent une caractérisation fine des flores présentes dans les laits, les fromages, mais aussi dans des « réservoirs » potentiellement en lien avec les flores des produits comme l'ambiance ou le matériel.

Les tests qui reproduisent les mécanismes technologiques

Notamment en pâtes pressées cuites, le test de lactofermentation est depuis longtemps utilisé. En Comté, il a été établi un lien entre le résultat de ce test et la qualité des fromages. En conseil technique (Beaufort par exemple), ce test est considéré comme un bon indicateur des pratiques d'élevage. En production fermière caprine, des déclinaisons de ce test (complété avec la mesure de l'acidification et utilisé en comparaison entre du lait UHT et du lait cru et un apport ou non de ferments de la ferme) sont testées pour détecter au plus tôt des dérives technologiques.

2 – Connaissance des écosystèmes microbiens des laits et des fromages

Il s'agit ici d'une synthèse des recherches récentes (ou encore en cours) mises en œuvre pour améliorer les connaissances à des fins d'une meilleure maîtrise des processus fromagers.

Un équilibre microbien dans la ferme qui évolue

Les différentes études en exploitation caprine montrent que dans chaque ferme les équilibres microbiens présentent une certaine stabilité. Mais l'équilibre observé évolue dans le temps en fonction des saisons et de l'année. Le plus souvent, les modifications importantes dans les équilibres de flores du lait ont pu être rapprochées d'événements observés (météo, panne de matériel, changement des manchons, mise à l'herbe...).

Des pratiques d'élevage en lien avec l'écosystème microbien du lait

Les techniques de nettoyage du matériel de traite, la nature de la litière, le nettoyage des trayons, le pâturage ont des effets sur les flores des laits (en chèvre – étude en Rocamadour et Pélardon- comme en vache – étude en Savoie-). Au delà des « pratiques », ce sont les classements par « système » ou même par « comportement » qui caractérisent le mieux les différences entre élevages.

Une étude en Comté montre que les conditions de logement des vaches ont une incidence sur la richesse en souches différentes (diversité). Le suivi des différents Lactobacilles Hétéro Fermentaires (LHF) depuis les aliments jusqu'au lait, montre que le trayon (en lien avec le matériel, la litière et l'ambiance) est l'élément le plus important dans l'apport des germes dans le lait. Toutefois, dans le suivi des « souches » (suivi plus fin que celui des espèces), les phénomènes de transferts de flores sont moins évidents.

Etudié au niveau des groupes microbiens, les résultats obtenus dans les Savoie sur la charge microbienne des trayons soulignent l'importance des litières par rapport à celle des bouses comme sources potentielles de flore microbienne d'intérêt pour les trayons.

En fabrication fromagère : le levain naturel, une gestion dans le temps de l'écosystème microbien

La technique consistant à reproduire le processus fermentaire par utilisation d'un support de flore issu de la fabrication précédente est utilisée depuis des temps anciens et

encore aujourd'hui de manière significative pour certains produits (pain, bière, fromage). C'est par cette technique que des fromages « cultivent » la typicité des produits.

En cas d'utilisation de lactosérum comme ferment pour la fabrication suivante, la synergie qui se développe entre l'équilibre du lait cru et l'écosystème du lactosérum génère chaque jour un nouvel équilibre (études en Rocamadour). C'est par l'observation des souches qu'il est possible de comprendre les évolutions de cet équilibre et d'anticiper des dérives de performances. La non maîtrise de ces équilibres peut amener le fromager à adopter, souvent de façon irréversible, un apport exogène de flores pour sécuriser la réussite de la fabrication.

En affinage, le bois, un conservateur d'écosystèmes microbiens

L'étude des planches (Comté, Reblochon, Tomme, Munster, Mont d'Or), utilisées pour l'affinage des fromages, montre que le bois est un matériau poreux, capable d'absorber et de relâcher de l'humidité. Les flores présentes sur sa surface sont le reflet direct des flores de surface des fromages. Les techniques traditionnelles de nettoyage (le plus souvent par brossage à l'eau et séchage naturel) préservent les flores utiles qui pourront ainsi être transmises aux fromages entrant en affinage. En conditions normales, le biofilm des planches ne contient pas de pathogènes.

3 – Les effets protecteurs des écosystèmes microbiens « naturels »

Comme pour le précédent chapitre, il est ici question de faire le point sur l'avancement des connaissances. Pour cette partie, un premier travail de synthèse a été entrepris. Il est en effet envisagé de produire, dans les mois qui suivent, une fiche faisant le point sur ce sujet. Par ailleurs, il a été souhaité que les recherches sur cet aspect fassent l'objet de davantage de publications, arguments fondamentaux pour alimenter les débats sur les pratiques et les savoir faire.

Des mécanismes complexes

La protection consiste à limiter le développement des bactéries potentiellement pathogènes (blocage, arrêt ou ralentissement) tout en évitant des déséquilibres microbiens. Le mécanisme peut être biologique (synergie, commensalisme, ou, à l'inverse, antagonisme ou compétition) ou bien reposer sur des principes ne relevant pas du vivant (température, hygrométrie, teneur en oxygène...). Dans ces différents cas, la bio-protection repose sur des éléments inhibiteurs (acides, peptides...), sur des nutriments (présents ou absents), sur des modifications physico-chimiques (acidité) ou encore sur des compétitions (colonisation).

Le potentiel d'inhibition naturel du lait ...

Les écosystèmes naturellement présents dans le lait peuvent présenter des potentialités d'inhibition de *Staphylococcus aureus*. Ce potentiel pourra s'exprimer à de moments technologiques différents. Il est indépendant de la capacité acidifiante, il est affaibli par l'apport de fortes doses de ferments et il est variable en fonction des souches de *S. aureus*

...et des planches d'affinage

Les planches d'affinage peuvent constituer des systèmes inhibiteurs de *Listeria monocytogenes* grâce à la présence des populations microbiennes assurant une compétition pour l'espace et les nutriments.

Pour lutter contre une contamination : les limites de la recherche de la souche « miracle »

Une approche consiste à repérer une souche qui a un pouvoir d'inhibition des pathogènes. Une étude partant, au départ de 147 souches, a effectivement permis de repérer un *Lactococcus garviae* qui, après validation, pourrait être proposé dans certaines fabrications fermières. Mais cette approche est aléatoire et lourde.

Une voie plus prometteuse : la compréhension des systèmes inhibiteurs constatés sur le terrain.

Il s'agit alors d'essayer d'isoler et de simplifier les écosystèmes microbiens présents dans des fromages pour lesquels on suspecte l'existence d'un système protecteur. L'objectif est d'orienter les pratiques favorisant l'écosystème repéré et/ou de proposer des cocktails de souches sélectionnées capables d'en reproduire les effets.

Encore de l'ordre du concept : la « technologie des barrières ».

La meilleure prévention du danger pathogène repose sur la compréhension et la mise en œuvre (ou la préservation) d'actions ou mécanismes ayant un effet barrière. Ainsi, le système pourra utiliser séquentiellement (ou simultanément) la température, l'activité de l'eau, le pH, la production d'acide acétique... Ce n'est plus alors dans l'efficacité d'une « barrière » que repose la sécurité mais dans la maîtrise de barrières successives. Cette proposition est définie dans le Codex Alimentarius comme *l'utilisation d'une combinaison de facteurs pour assurer la maîtrise du développement microbien.*

4 – Quelle stratégie au niveau des filières ?

Ce chapitre fait état des débats organisés entre chercheurs et techniciens sur la question : quel lait pour des fromages spécifiques ? Il avait été souhaité de traiter de façon distincte cette question entre les filières fermière, artisanale (fruitières) et industrielle. Les conclusions se sont avérées assez communes entre les différentes situations structurelles.

Les limites de l'approche par le défaut

Les actions techniques restent très orientées vers la correction ou la prévention des défauts. Dans cette approche, le germe ou le groupe de germes responsables ont été le plus souvent identifiés : coliformes, psychrotrophes... Dans beaucoup de cas, un suivi bactériologique est mis en place et, si le lait est collecté, les résultats de ce suivi sont intégrés dans le paiement du lait à la qualité.

Mais cette approche présente des limites :

- le producteur de lait (ou le fromager) n'est associé qu'à la partie négative de la qualité (un « bon » fromage n'est pas uniquement un produit sans défaut),
- la pression hygiénique peut amener à l'adoption de pratiques qui déséquilibrent les processus fermentaires rendant la fabrication davantage sensible aux défauts et la prévention est très difficile à mettre en place,
- dans la plupart des cas, le constat est tardif ; le processus curatif alors mis en place n'est pas sélectif et affecte les germes indésirables comme les germes d'intérêt.

Les difficultés pour caractériser la qualité

Tout le monde s'accorde aujourd'hui pour affirmer que les caractéristiques organoleptiques « positives » d'un fromage ne sont pas le fait d'un seul germe mais plutôt le résultats d'équilibres microbiens complexes en interaction avec les éléments physico-chimiques. L'équilibre de départ, celui du lait, est considéré comme la base qui évoluera par l'apport de ferments, la technologie, l'ambiance...

En dehors des programmes de recherche, seul le test de lactofermentation (ou ses déclinaisons) est utilisé pour caractériser l'équilibre du lait (et/ou des ferments). Les moyens de définition des composantes de cet équilibre sont encore du domaine de la recherche. L'utilisation de milieux sélectifs, les travaux sur la simplification des écosystèmes devraient permettre, à moyen terme, de disposer de moyens de qualification positive.

La caractérisation doit se faire produit par produit. Les bases pour définir les équilibres microbiens recherchés sont assez mal établies et peu partagées. L'analyse de la technologie doit intégrer aussi les interactions physico-chimiques. De plus, dans une même technologie, des premiers résultats montrent que les niveaux d'intensification en élevage (niveau énergétique de la ration et flore microbienne) et en fromagerie (doses de ferments) génèrent des caractéristiques organoleptiques différentes.

Dans la définition des équilibres recherchés, deux approches sont possibles, et peuvent quelquefois s'opposer :

- l'approche montante consiste à considérer qu'un lait produit « normalement » dispose d'un équilibre « naturel », lié à une combinaison entre les conditions du milieu et les pratiques d'élevage. Le travail en aval du collecteur, du fromager, de l'affineur et du commercial sera alors de s'appuyer sur cet équilibre pour en exprimer puis en valoriser le potentiel. Dans cette logique, le fromage est considéré comme l'expression du lieu, indépendamment de la recherche d'une satisfaction à des besoins plus ou moins clairement exprimés du consommateur. Dans cette logique, la variabilité inter saisons (ou inter années) des caractéristiques des fromages est une richesse à conserver...
- à l'inverse, une approche descendante va partir d'une analyse fine du produit et en particulier dans ses caractéristiques organoleptiques. Le croisement des éléments de caractérisation et des fondements de la technologie amène alors à proposer des équilibres concernant les flores à tous les niveaux, et ceci en remontant éventuellement jusqu'au lait.

Dans les deux cas, le souci de reproductibilité des conditions d'amont ou d'aval nécessite la définition d'indicateurs mesurables et quantifiables soit des pratiques mises en place, soit des équilibres microbiens.

En conclusion

Dans les technologies utilisant des écosystèmes naturels (le lait cru, le lactosérum comme ferment, le bois...), la préoccupation du défaut prend le pas sur le risque sanitaire. Les actions techniques à tous les niveaux du processus et la mise en place des prélèvements

libératoires ont permis de réduire le risque d'accident sanitaire. Par ailleurs, les (petites) anomalies courantes dans le passé ne sont plus acceptées et sont considérées comme des défauts.

Les fromages utilisant des écosystèmes naturels le font pour préserver des caractéristiques originales et positives (en terme de qualité) des produits. Ils revendiquent souvent la protection de cette originalité par l'AOC ou la dénomination fermière.

Il est maintenant admis que le résultat constaté sur le fromage (caractéristiques organoleptiques en particulier) est le fait d'équilibres microbiens complexes¹ dans lesquels les apports naturels par le lait, le matériel, l'environnement jouent un rôle décisif. Cette notion de complexité comprend des notions de diversité (grand nombre de souches différentes), les interactions avec les conditions du milieu et du produit (température, Aw...), les évolutions dans le temps...

En cas de défaut, la stratégie généralement admise consistait à rechercher le germe lié au défaut en altérant le moins possible l'écosystème « naturel » considéré alors comme un complexe un peu « magique » à respecter. Les composants (ou certains d'entre eux) de cet écosystème pouvant relever de la notion de patrimoine. A l'extrême, l'étude fine des équilibres naturels pourrait conduire à définir les conditions de leur reproductibilité en dehors de la zone d'origine.

Mais cette approche par le défaut a montré ses limites. La question est donc de passer de la prévention des défauts à la maîtrise de critères spécifiques de qualité.

C'est en trois phases successives que la question pourrait être traitée :

- L'implication de tous : la mise en place de contrôles de plus en plus stricts (avec le développement de cahiers des charges), l'éloignement technique entre les maillons de la filière, font que les différents partenaires ont du mal à se mettre d'accord sur les éléments de la qualité (au delà de la prévention des défauts). Le souci du projet de l'autre peut aussi favoriser le dialogue ; l'exemple de la coopérative Jeune Montagne prenant en charge le service remplacement en élevage est significatif d'un souci de traiter une contrainte en production sans lien direct avec la qualité.
- Le partage du risque qualité : la deuxième phase peut avoir pour objectif de combiner les approches montantes (respect du lait) et descendantes (prise en compte des souhaits des consommateurs). Cette co-construction devrait permettre d'établir de façon raisonnable les éléments techniques de la qualité : germes utiles, équilibres à respecter, pratiques associées... Il s'agit ici, pour les filières, de quitter le comportement « consignes pour la qualité » pour un débat permanent sur « les caractéristiques du lait et du produit ».
- La troisième phase est encore du domaine du rêve ; c'est la « bandelette typicité » pour la maîtrise en temps réel. Les progrès techniques et scientifiques permettront de définir, pour chaque produit et à chaque étape du processus, les équilibres recherchés. Il sera alors techniquement possible de réaliser un test rapide (voire immédiat) permettant de s'assurer du respect de cet équilibre et de mettre en place les mesures

¹ Il n'existe pas d'étude scientifique argumentant spécifiquement et de façon univoque cette affirmation. Mais le groupe de techniciens et de chercheurs réuni à Laguiole a fait état, et pour la première fois de façon aussi unanime, d'une conviction partagée sur cette affirmation.

correctives *ad hoc*. Le groupe ne se prononce pas encore sur la forme de ce test. C'est pour cela que le terme « bandelette » est entre guillemets...