



HAL
open science

Étude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère

Jomaa Alomar

► To cite this version:

Jomaa Alomar. Étude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2007. Français. NNT : 2007INPL051N . tel-01752847

HAL Id: tel-01752847

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752847v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE (INPL) N°D.U

École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)

ECOLE DOCTORALE
Des Ressources, Procédés, Produits, Environnement (RP2E)

N° d'ordre

Année 2007

Thèse

Présentée à l'Institut National Polytechnique de Lorraine
Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'INPL
(Specialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires)

Soutenue le 13 Septembre 2007

Jomaa ALOMAR

**Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et
Lactococcus garvieae pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en
technologie fromagère**

Président: M. Pascal LOUBIERE, Directeur de Recherches à l'INSA, Toulouse.

Rapporteurs: Mme Régine TALON, Directrice de Recherches INRA à St-Genès-Champanelle, Clermont- Ferrand.

M. Eric BEUVIER, Directeur de l'INRA de Poligny (HDR).

Membres: M^{elle} Marie-Christine MONTEL, Directrice de Recherches, INRA Aurillac, Co-directeur de thèse.

M. Jean -Bernard MILLIERE, Professeur, Directeur de recherche à l'ENSAIA-INPL de Nancy, Directeur de la thèse.

Unité de Recherches Fromagères – Institut National de la Recherche Agronomique - Aurillac

Laboratoire de Sciences et Génie Alimentaires- INPL- ENSAIA- Nancy

A Maman, à Papa

Pour tout l'amour que vous m'avez donné

Vous resterez à jamais dans mon cœur.

Vous m'avez donné les moyens d'en arriver là

Mais vous êtes partis avant d'en récolter le fruit

Je pleure mais je souhaite que le résultat vous plaise

Vous

Qui m'avez tout appris

Et tant donné

C'est dans vos yeux que je grandissais

Et me sentais fier

Vous ne m'avez pas laissé le temps

De vous dire tout ce que je vous aime

Ni tout ce que vous me manquez

On devrait toujours dire avant

L'importance que les gens prennent

Tant qu'il est encore temps;

Vous ne m'avez pas laissé le temps.

Lionel Florence/David Hallyday

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier tous les rapporteurs de cette thèse: Madame **Régine TALON**, Directrice de Recherches dans l'Unité Microbiologie de l'INRA de Clermont-Ferrand et Monsieur **Eric BEUVIER**, Directeur de Recherches dans l'Unité de recherche Technologie et Analyses Laitières de l'INRA de POLIGNY, Dijon pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. J'ai apprécié leur lecture attentive du document de thèse malgré un emploi du temps chargé.

Mon remerciement m'a réservé à Monsieur **Pascal LOUBIERE** Directeur de Recherche à l'INSA Toulouse pour son implication dans certaines expérimentations de travail et sa participation à ce jury.

Mon remerciement m'a réservé à Monsieur **André LEBERT**, Unité Recherches Qualité des Produits Animaux, INRA de Theix pour son implication dans certaines analyses statistiques dans cette thèse.

Je tiens à remercier **l'université d'ALBAATH** en Syrie qui m'a attribué une bourse pour poursuivre mes études dans des laboratoires français.

Je remercie infiniment le directeur de ma thèse Monsieur **Jean-Bernard MILLIERE** qui a accepté de m'accueillir dans son équipe pour préparer mon DEA et qui m'a orienté vers l'Unité de Recherches Fromagères (URF) à Aurillac pour réaliser cette thèse. Merci de m'avoir encouragé et de m'avoir conseillé.

Je souhaite également exprimer ma profonde reconnaissance et mes remerciements à Madame **Marie-Christine MONTEL**, co-directeur de la thèse, qui a accepté de m'accueillir dans son équipe pour préparer ma thèse, pour sa constante disponibilité, ses conseils, les nombreuses discussions qui ont eu lieu tout au long de ces quatre années et son aide précieuse pour la rédaction des articles et du mémoire. Merci de vos encouragements et de vos larmes au moment du décès de mon père. Merci Marie-Christine.

Je remercie sincèrement **Céline DELBES**, pour sa gentillesse et pour le temps qu'elle a consacré à m'écouter et à corriger mes travaux.

J'exprime également ma profonde gratitude aux autres membres de l'équipe de l'Unité des Recherches Fromagères **Isabelle, Cécile, Marjorie, Béatrice, Michèle, Robert, René**, pour leur gentillesse, leur disponibilité quotidienne à toute épreuve, pour leur patience et pour m'avoir autant aidé au cours de ces quatre années.

Je tiens à remercier très chaleureusement les étudiants en thèse, en Master et les stagiaires pour tous les bons moments que nous avons partagés ensemble.

Enfin, je tiens à remercier très sincèrement mes parents en Syrie, ma femme **Hasnaa** et mes enfants, **Nourah, Omar** et **Mahmoud**, pour leur soutien inconditionnel, leur patience et leurs encouragements.

Table des matières

Introduction.....	1
Etude bibliographique	
I. Microorganismes du fromage.....	3
I.1. Les microorganismes non pathogènes du lait et du fromage.....	3
I.1.1. Les bactéries lactiques.....	3
- Le genre <i>Lactococcus</i>	4
-Taxonomie.....	4
- Méthodes d'identification des espèces du genre <i>Lactococcus</i> dont <i>L. garvieae</i>	4
- Métabolisme	5
- Prévalence des <i>Lactococcus</i> dans les produits laitiers.....	5
- Innocuité	6
I.1.2. <i>Staphylocoques</i> et bactéries corynéformes	6
I.1.3. Les levures et moisissures.....	7
I.1.4. Les bactéries à Gram négatif.....	7
I.2. Les microorganismes pathogènes du lait et du fromage.....	8
I.2.1. <i>Salmonella</i>	8
I.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	8
II. Le genre <i>Staphylococcus</i>	9
II.1. <i>Staphylococcus aureus</i> au sein du genre <i>Staphylococcus</i> : Taxonomie.....	9
II.2. Méthodes d'identification des espèces du genre <i>Staphylococcus</i> dont <i>S. aureus</i> . 10	
II.2.1. Identification au niveau espèce	10
II.2.2. Typage des souches de <i>S. aureus</i>	11
II.2.3. Dénombrement des <i>Staphylococcus</i> à coagulase positive	11
II.3. Habitat de <i>S. aureus</i>	12
II.4. Toxicité de <i>S. aureus</i>	12
II.4.1. Infections spécifiques liées aux toxines de <i>S. aureus</i>	12
II.4.2. Toxi- infection alimentaire	13
II.4.2.1 Caractéristiques des entérotoxines staphylococciques	13
II.4.2.2. Détection des entérotoxines staphylococciques	14
II.5. Maîtrise de <i>S. aureus</i> : croissance et production d'entérotoxines.....	15
II.5.1. Effet des facteurs abiotiques	16
II.5.1.1. Effet de la température	16
II.5.1.2. Effet de la concentration en sel (NaCl).....	16
II.5.1.3. Effet de l'activité de l'eau (a_w).....	16
II.5.1.4. Exigences nutritionnelles	17
II.5.1.5. Effet du potentiel d'oxydoréduction	17
II.5.1.6. Effet des hautes pressions	18
II.5.2. Effet de facteurs biotiques	18
II.5.2.1. Effet du pH	18
II.5.2.2. Métabolites microbiens inhibiteurs	19

- Les bactériocines	19
- Le peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	20
Toxicité du peroxyde	20
Production bactérienne d'H ₂ O ₂	21
Activités antioxydantes de <i>S. aureus</i> et des bactéries lactiques.....	22
- Acides gras et monoglycérides	23
- Diacétyle	23
-Populations microbiennes impliquées dans la synthèse des molécules inhibitrices	24
II.6. Comportement de <i>S. aureus</i> dans des produits laitiers.....	24
II.6.1. Sources de contamination des laits et des fromages	24
II.6.2. Comportement de <i>Staphylococcus aureus</i> dans les fromages et production d'entérotoxines.....	25

Matériels et méthodes

1. Croissance de <i>Staphylococcus</i> coagulase positive (SC+) et production d'entérotoxines dans des fromages fermiers AOC Saint-Nectaire.....	27
1.1. Le fromage AOC Saint-Nectaire	27
1.2. Choix des exploitations.....	28
1.3. Fabrication des fromages AOC Saint-Nectaire.....	28
1.4. Prélèvements	28
1.5. Paramètres physico-chimiques.....	28
1.6. Analyses microbiologiques et milieux de culture.....	29
1.7. Détection des entérotoxines staphylococciques dans le fromage	29
1.8. Analyse statistique	29
2. Effet de la présure et du broyage sur le dénombrement de <i>Staphylococcus</i> coagulase positive dans les laits..	30
2.1. Sélection de la souche de <i>S. aureus</i>	30
2.2. Préparation de l'inoculum de <i>S. aureus</i> SA15.....	30
2.3. Collecte du lait	30
2.4. Protocole d'ensemencement de lait	31
2.5. Condition d'incubation.....	31
2.6. Fabrication expérimentale des fromages de type Saint-Nectaire.....	31
2.7. Dénombrement des <i>Staphylococcus</i> à coagulase positive	32
2.8. Mesure du pH.....	32
2.9. Analyse statistique	32
3. Effet des souches de <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Lactococcus lactis</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> sur le comportement de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3.1. Effet du pH initial du lait sur la croissance de <i>S. aureus</i> SA15	33
3.2. Co-cultures de <i>S. aureus</i> SA15 avec <i>Lactococcus</i> et <i>Enterococcus</i> en lait microfiltré	33
3.3. Co-cultures de <i>S. aureus</i> SA15 avec <i>L. garvieae</i> N201, <i>L. lactis</i> N658 ou <i>E. faecalis</i> N516 en milieu tamponné	34
3.4. Conditions d'incubation et prélèvement.....	34
3.5. Dénombrement des microorganismes.....	34
3.6. Analyses biochimiques	35

3.7. Recherche des substrats inhibiteurs dans les surnageants de culture.....	36
3.8. Analyse statistique	36
4. Effet de la température et du pH sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en co-culture avec une souche inhibitrice de <i>Lactococcus garvieae</i>	37
4.1. Facteurs étudiés.....	37
4.2. Dénombrement des microorganismes	38
4.3. Détection des entérotoxines staphylococciques.....	38
4.4. Mesure du pH.....	38
4.5. Analyse statistique et interprétation des résultats	38
5. Interaction entre <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Lactococcus garvieae</i> et la production de peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)..	39
5.1 Sensibilité de différentes souches de <i>S. aureus</i> à l'H ₂ O ₂	39
5.2. Activité catalasique des "cellules au repos" de <i>S. aureus</i> SA15.....	39
5.3. Production de peroxyde d'hydrogène par des souches de <i>L. garvieae</i> , <i>L. lactis</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	40
5.4. Effet de l'agitation sur la production de H ₂ O ₂ par <i>L. garvieae</i> N201	40
5.5. Co-culture de <i>S. aureus</i> avec <i>L. garvieae</i>	40
5.6. Effet de la température de culture sur l'activité catalasique des "cellules au repos"	40
5.7. Détermination de la concentration de peroxyde d'hydrogène.....	41
5.8. Effet de l'ajout de catalase exogène sur l'inhibition de <i>S. aureus</i> par <i>L. garvieae</i>	41
5.9. Dénombrement de <i>S. aureus</i> et <i>L. garvieae</i>	41
5.10. Analyse statistique	41

Résultats

Chapitre 1: Croissance des <i>Staphylococcus</i> à coagulase positive (SC+) et production d'entérotoxine pendant la fabrication du fromage A.O.C Saint-Nectaire.	42
1.1. Objectif	42
1.2. Méthodologie	42
1.3. Résultats.....	42
1.3. Conclusion	45
Travaux complémentaires	47
1. Effet du broyage du lait sur la numération des <i>Staphylococcus</i> coagulase positive.....	47
2. Comparaison de la croissance de <i>S. aureus</i> SA15 et des SC+ dans le lait, lait caillé et fromage.....	47
3. Conditions de préculture des souches	48
Chapitre 2: Effet des souches de <i>Lactococcus garvieae</i> , <i>Lactococcus lactis</i> et <i>Enterococcus faecalis</i> sur le comportement de <i>Staphylococcus aureus</i>	49
2.1. Objectif	49
2.2. Méthodologie	49
2.3. Résultats.....	49

Chapitre 3: Effet de la température et du pH sur la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> et sa production d'entérotoxines en co-culture avec une souche inhibitrice de <i>Lactococcus garvieae</i>	71
3.1. Objectif	71
3.2. Méthodologie	71
4.3. Résultats	71
Chapitre 4: Rôle du peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) dans l'inhibition de <i>S. aureus</i> par les <i>Lactococcus</i> . Etude de l'interaction <i>S. aureus</i> SA15 – <i>L. garvieae</i> N201.....	84
4.1. Objectif	84
4.2. Résultats	84
4.3. Discussion-conclusion	88
Conclusions et perspectives.....	91
Références.....	94

LISTE DES TABLEAUX

Etude bibliographie

Tableau 1: Espèces de bactéries à Gram positif, levures et moisissures isolées de lait ou de fromage

Tableau 2 : Critères microbiologiques des fromages au lait cru (Directives paquet hygiène N° 852 et 853-2004)

Tableau 3: Caractères distinguant les différents genres de la famille des *Staphylococcaceae*

Tableau 4 : Espèces de *Staphylococcus* selon www.bacterio.cict.fr

Tableau 5: Principaux caractères permettant de différencier les espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus* produisant ou pouvant produire une coagulase.

Tableau 6 : Amorces spécifiques pour l'identification d'espèces de *Staphylococcus* coagulase positive

Tableau 7: Biotype de *Staphylococcus aureus*

Tableau 8 : Principaux facteurs de virulence de *S. aureus*

Tableau 9 : Entérotoxines staphylococciques; propriétés biochimiques et biologiques.

Tableau 10: Bactéries productrices de bactériocines inhibitrices de *S. aureus*

Tableau 11: Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par différentes espèces bactériennes et inhibition de *S. aureus*

Tableau 12: Niveau maximal de *S. aureus* dans les fromages et production des entérotoxines.

Matériels et méthodes

Tableau 13: Conditions de dénombrement : milieux, temps et températures d'incubation

Tableau 14 : liste des souches bactériennes

Tableau 15: Composition des différents milieux étudiés pour la croissance de *S. aureus*.

Tableau 16 : Combinaisons testées selon le plan de Doehlert.

Résultats

Tableau 17 : Types du levain lactique inoculé et conditions d'emprésurage

Tableau 18: Corrélations entre la croissance de *Staphylococcus* coagulase positive et les niveaux des flores microbiennes dénombrées sur différents milieux et l'extrait sec de fromage.

Tableau 19: Différence de numération (delta) (LogN (lait traité)- LogN (lait non traité)) de *Staphylococcus* coagulase positive entre des laits traités 4 minutes au Stomacher ou non traités.

Tableau 20: Croissance de *S. aureus* (a) souche SA15 en lait pasteurisé, lait pasteurisé caillé et fromage au lait pasteurisé. b) souches naturellement présentes en lait AOC Salers, lait AOC Salers caillé et fromage au lait AOC Salers.

Tableau 21: Effet du milieu de préculture sur la croissance (delta) de *S. aureus* SA15 en culture seule en lait microfiltré.

Tableau 22: Evolution de *S. aureus* SA15, *L. garvieae* N201 et la valeur de pH en fonction de temps dans différents milieux de culture.

Tableau 23: Coefficients de régression obtenus pour l'effet de la température, pH et concentration de *L. garvieae* N201 sur la croissance de *S. aureus* SA15 à 3, 6, 9, 24 et 48 h.

Tableau 24: Niveaux (logN) des souches de *S. aureus* d'origine diverse inoculées en milieu BHI tamponné à pH 6,8 avec différentes concentrations d'H₂O₂ (0, 1, 2, 3 et 4 mmol/l).

Tableau 25: Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par des souches de *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* et *Lactococcus garvieae* dans un milieu BHI tamponné à pH 6,8 à 30°C sans agitation.

Tableau 26 : Effet de l'agitation sur la concentration d'H₂O₂ et le niveau de *L. garvieae* en milieu BHI tamponné à pH 6,8 et incubé à 30°C.

Tableau 27: Croissance de *S. aureus* SA15 en culture seule ou en co-culture avec *L. garvieae* N201 à 30, 24 et 18°C. L'inhibition est exprimée en $\Delta = \text{Log} [S. aureus \text{ en culture seule}] - \text{Log} [S. aureus \text{ en co-culture avec } L. garvieae \text{ N201}]$.

Tableau 28: Niveau de *S. aureus* SA15 en BHI tamponné à pH 6,8 en culture seule ou en co-culture avec *L. garvieae* N201 avec ou sans addition de catalase. La catalase a été ajoutée à la co-culture de *S. aureus* SA15 avec *L. garvieae* N201 à concentration (0, 500, 1000, 2000 et 4000 IU/ml).

Tableau 29: Activité catalasique ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min}$ pour 10^8 ufc/ml de SA15) de cellules de *S. aureus* SA15 précultivées à 30, 24 et 18°C en culture seule ou en co-culture avec *L. garvieae* N201.

LISTE DES FIGURES

Etude bibliographique

Figure 1: Implication de *S. aureus* en pathologie humaine

Matériel et méthodes

Figure 2 : Protocole de fabrication de mini-fromage type Saint –Nectaire

Figure 3 : Plan de Doehlert

Résultats

Figure 4: Niveau de *Staphylococcus* coagulase positive (SC+) dans des fromages AOC Saint-Nectaire pendant les premières 24 h de fabrication puis après 8 jours et 28 jours d'affinage.

Figure 5: Evolution des valeurs de pH dans des fromages AOC Saint-Nectaire pendant les premières 24 h de fabrication puis après 8 jours et 28 jours d'affinage.

Figure 6: Niveaux des flores microbiennes dans des fromages AOC Saint-Nectaire pendant les premières 24 h de fabrication puis après 8 jours et 28 jours d'affinage.

Figure 7: Analyse en Composantes Principales des flores dans les fromages à 24 h, en prenant en compte des dénombrements microbiens sur milieu M17, milieu MSE, milieu FH, milieu Turner (Tr), milieu SB, milieu VRBG, milieu CFC, milieu OGA et milieu RPFA.

Figure 8: Relation entre l'accroissement des *Staphylococcus* coagulase positive entre 6 et 24 h et les valeurs de pH à 6 h.

Figure 9: Evolution de *S. aureus* SA15 en fonction de temps d'incubation à 30°C, 24°C et 18°C dans un milieu BHI tamponné à pH 6,8.

Figure 10: Evolution de *L. garvieae* N201 en fonction de temps d'incubation à 30°C, 24°C et 18°C dans un milieu BHI tamponné à pH 6,8.

Figure 11: Production d'H₂O₂ en fonction de temps d'incubation à 30°C, 24°C et 18°C dans des surnageants de culture de *L. garvieae* N201 en milieu BHI tamponné à pH 6,8.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATION

Publications périodiques à comité de lecture

Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F., Montel, M.C. (2006) *Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin Production during Manufacture of Non-Cooked, Semi-Hard Cheese from Cow's Raw Milk . *J. Food. Prot.* **69**, 2161-2167.

Alomar J., Loubiere P., Delbes C., Nouaille S., Montel, M.C. (2007) Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. (**Food Microbiology, en revision**).

Alomar J., Lebert A., Montel M. C. (2007) Effect of temperature and pH on the growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*. (**Soumis, Current Microbiology**).

Communications courtes dans congrès sous forme de posters

Alomar J., Loubière P., Delbès C., Montel M.C., Effet de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en lait entier microfiltré. 14^{ème} colloque du club des bactéries lactiques. Paris, 17-19 mai 2006

Alomar J., Montel M.C., 2007. Pourquoi *Lactococcus garvieae* inhibe *Staphylococcus aureus* ?. SFM VIIème congrès national. Nantes, 30-31 mai et 1 juin 2007

Communications orales

Alomar J., Montel M.C., 2007. Inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactococcus garvieae*. 4^{ème} rencontre des microbiologistes du pôle clermontois. Clermond-Ferrand, 29 mars 2007.

Alomar J., Montel M.C., 2007. Pourquoi *Lactococcus garvieae* inhibe *Staphylococcus aureus* ?. SFM VIIème congrès national. Nantes, 30 mai 2007.

INTRODUCTION

Introduction

Tous les produits alimentaires mis sur le marché doivent répondre aux normes sanitaires en vigueur, imposées par la réglementation européenne. Les principaux critères microbiologiques à satisfaire pour les fromages sont définis dans la réglementation CEE N° 852 et 853-2004.

La législation européenne impose un niveau de contamination en *S. aureus* en fromage en dessous de 10^5 ufc/g. A des niveaux supérieurs à 10^5 ufc/g, la recherche d'entérotoxines devient obligatoire ce qui représente un coût économique important pour les filières.

La maîtrise de *S. aureus* est surtout une préoccupation pour les producteurs de fromages au lait cru car les laits crus ne subissent, avant la fabrication fromagère, aucun traitement thermique (pasteurisation, thermisation) ou physique (microfiltration) pour réduire le niveau des flores microbiennes. L'enjeu pour les producteurs au lait cru est de garantir la qualité sanitaire tout en préservant les qualités sensorielles. Ceci implique d'être capable de contrôler la composition des communautés microbiennes en éliminant les bactéries pathogènes sans réduire la biodiversité microbienne qui participe à l'élaboration des différentes dimensions de la qualité. L'absence totale de *S. aureus* dans le lait est très difficile à atteindre compte tenu du caractère très ubiquitaire de cette espèce, même si les niveaux de contamination par cette espèce ont été fortement réduits. En effet, cette amélioration, qui se traduit par des niveaux de *S. aureus* dans le lait inférieur à 20 ufc/ml, résulte d'un meilleur suivi de la santé des animaux, d'une meilleure hygiène de traite, d'une meilleure connaissance des sources de contamination grâce au typage des souches.

Pour maîtriser *S. aureus* en cours de fabrication fromagère au lait cru, la biopréservation peut être envisagée. Elle peut reposer, soit sur un enrichissement naturel du lait en flore antagoniste de *S. aureus* par des pratiques de production de lait adaptées, soit sur un ensemencement exogène raisonné de souches sélectionnées pour leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de *S. aureus*.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse sont:

- d'étudier l'évolution de *S. aureus* dans les fromages fermiers AOC Saint-Nectaire pour éventuellement repérer des populations microbiennes des laits crus potentiellement capables d'inhiber *S. aureus*.

- d'étudier les potentialités inhibitrices de souches de bactéries lactiques en se concentrant sur le genre *Lactococcus*.

Le manuscrit est organisé en 3 grands chapitres.

La première partie, dédiée à **l'étude bibliographique**, mentionne tout d'abord les espèces microbiennes identifiées dans les laits et fromages. Elle se focalise ensuite sur l'état des connaissances sur l'espèce *S. aureus* et les différents facteurs pour maîtriser sa croissance.

La deuxième partie présente le **Matériel et Méthodes** afférent aux expérimentations réalisées dans cette thèse.

La troisième partie relate les **résultats** obtenus. Elle est composée de 5 chapitres qui suivent la chronologie du travail. **Le premier chapitre** relate les résultats obtenus sur la croissance de *Staphylococcus* coagulase positive et la production d'entérotoxines dans des fromages fermiers AOC Saint-Nectaire. **Le deuxième chapitre** porte plus particulièrement sur l'effet des souches de *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* et *Enterococcus faecalis* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en lait microfiltré. Les travaux présentés dans **le troisième chapitre** ont pour objectif de préciser l'effet de la température et du pH sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en co-culture avec une souche inhibitrice de *Lactococcus garvieae*. **Le quatrième chapitre** concerne le rôle du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans l'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactococcus garvieae*. **Le cinquième chapitre** discute l'ensemble des résultats et énonce quelques perspectives.

**ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

Tableau 1: Espèces de bactéries à Gram positif, levures et moisissures de lait ou de fromage

Espèces	Produits laitiers	Références
Bactéries lactiques		
<i>Lactococcus</i>		
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	Lait- fromage	Callon et al., 2004
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	Lait- fromage	Zamfir et al., 2006
<i>Lactococcus garvieae</i>	Lait- fromage	El-Baradei et al., 2005
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	Lait- fromage	Lopez-Diaz et al., 2000
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Lait- fromage	Callon et al., 2004
<i>Lactopacillus plantarum</i>	Fromage	Callon et al., 2004
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Fromage	Berthier et al., 2001
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Fromage (Manchego)	Sanchez et al., 2006
<i>Lactobacillus delbruekii</i>	Lait fermenté	Escalante et al., 2001
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lait de chamelle	Khedid et al., 2007
<i>Leuconostoc</i>		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Fromage	Callon et al., 2004
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	Fromage	Callon et al., 2004
<i>Leuconostoc citreum</i>	Fromage	Callon et al., 2004
<i>Pediococcus</i>		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Fromage	Callon et al., 2004
<i>Streptococcus</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Fromage	Callon et al., 2004
<i>Streptococcus millieri</i>	Fromage	Callon et al., 2004
<i>Streptococcus salivarius</i>	Fromage	Callon et al., 2004
<i>Enterococcus</i>		
<i>Enterococcus faecalis</i>	Lait- fromage	Gelsomino et al., 2001
<i>Enterococcus faecium</i>	Lait- fromage	Callon et al., 2004
Bactéries non lactiques		
<i>Brachybacterium</i>		
<i>Brachybacterium nesterenkovii</i>	Fromage (Salers)	Duthoit et al., 2003
<i>Brachybacterium faecium</i>	Fromage (Salers)	Duthoit et al., 2003
<i>Brevibacterium</i>		
<i>Brevibacterium avium</i>	Fromage (Salers)	Duthoit et al., 2003
<i>Brevibacterium linens</i>	Fromage (Salers)	Duthoit et al., 2003
<i>Arthrobacter</i>		
<i>Arthrobacter bergerei</i>	Fromage	Irlinger et al., 2005
<i>Arthrobacter arilaitensis</i>	Fromage	Irlinger et al., 2005
<i>Arthrobacter nicotianae</i>	Lait cru	Delbes et al., 2007
<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	Lait cru	Delbes et al., 2007
<i>Corynebacterium</i>		
<i>Corynebacterium afermentans</i>	Fromage (Salers)	Duthoit et al., 2003
<i>Corynebacterium variabilis</i>	Fromage	Valdes-Stauber et al., 1997
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	Fromage	Valdes-Stauber et al., 1997
<i>Staphylococcus*</i>		
Levures		
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Fromage	Callon et al., 2006
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Fromage	Callon et al., 2006
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fromage	Callon et al., 2006
<i>Candida parapsilosis</i>	Fromage	Callon et al., 2006
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Fromage	Callon et al., 2006
<i>Candida krusei</i>	Fromage	Callon et al., 2006
<i>Pichia membranaefaciens</i>	Fromage	Callon et al., 2006
<i>Pichia fermentans</i>	Fromage	Callon et al., 2006
<i>Geotrichum candidum</i>	Fromage	Boutrou et Guéguen. 2005
Moisissures		
<i>Penicillium camembertii</i>	Fromage	Dupont et al., 1999
<i>Penicillium roquefortii</i>	Fromage	Aubert, 2003
<i>Cylindrocarpon heteronema</i>	Fromage (Saint-nectaire)	Ratomahenina et al., 1995

*Les espèces de genre *Staphylococcus* sont présentées dans le tableau 4

I. Microorganismes du fromage

Dans les fromages au lait cru, les micro-organismes des fromages peuvent provenir du lait contaminé qui ne subit aucun traitement après la traite mais aussi de ferments qui peuvent être rajoutés dans le lait en début de fabrication.

I.1. Les microorganismes non pathogènes du lait et du fromage

I.1.1. Les bactéries lactiques

Les principales espèces de bactéries lactiques identifiées dans les laits ou les fromages sont inventoriées dans le tableau 1. Les bactéries lactiques ont un rôle primordial en fabrication fromagère. Elles participent à l'acidification du lait aux premières étapes de la fabrication. Ainsi les espèces de *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* et *Leuconostoc mesenteroides* rentrent dans la composition de ferments ajoutés dans le lait.

Les bactéries lactiques thermophiles essentiellement représentées par les espèces *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* en association avec *Streptococcus thermophilus* entrent dans la composition des levains thermophiles. Les souches de ces espèces sont sélectionnées pour leurs propriétés acidifiantes et aromatisantes. En effet, suivant les espèces, elles sont capables de dégrader le lactose par voie homofermentaire (production de D et ou L-lactate) ou hétérofermentaire (production de CO₂, éthanol ... acétate). Elles peuvent produire des composés d'arôme à partir des acides aminés (Kranenburg et al., 2002), à partir du pyruvate.

Le genre *Enterococcus* fait l'objet de nombreuses études en raison de sa position entre risque sanitaire et intérêt technologique. En effet, les espèces de ce genre peuvent participer à l'élaboration des caractéristiques sensorielles (Giraffa, 2003) mais elles ne sont pas reconnues sans risque et n'ont pas le statut de GRAS (Generally-Recognised-As-Safe) car elles possèdent des gènes codant pour des facteurs de virulence (Elsner et al., 2000).

Le genre *Lactococcus* sera plus particulièrement développé car la thèse traite entre autres de l'interaction entre les espèces de ce genre et *Staphylococcus aureus*.

- Le genre *Lactococcus*

-Taxonomie

Le genre *Lactococcus* a été proposé par Schleifer et al. (1985) pour reclasser des souches du genre *Streptococcus* (*Streptococcus* du groupe N) et des espèces de *Lactobacillus*. Il a été défini sur la base de critères chémitaxonomiques et du séquençage d'ARNr 16S (Schleifer et al., 1985; Collins et al., 1989). Le genre *Lactococcus* comprend 5 espèces (www.bacterio.cict.fr). *Lactococcus garvieae* antérieurement identifié à *Enterococcus seriolicida* (Kusuda et al., 1991; Teixeira et al., 1996), *Lactococcus piscium*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus plantarum* et *Lactococcus lactis* qui est subdivisé en 3 sous-espèces, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* et *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* antérieurement classifié dans le genre *Lactobacillus*. Les espèces de *Lactococcus* sont des coques, à Gram positif au métabolisme homofermentaire produisant exclusivement de l'acide lactique (L+). Elles ont un optimum de croissance voisin de 30°C et ne poussent pas à pH 9,6 ou en présence de 6,5 % de NaCl. Excepté l'espèce *Lactococcus garvieae*, elles ne sont pas hémolytiques.

- Méthodes d'identification des espèces du genre *Lactococcus* dont *L. garvieae*

Les espèces de *Lactococcus* peuvent être facilement identifiées par des techniques moléculaires rapides et fiables. Des sondes oligonucléotidiques ciblant l'ARNr 16S permettent d'identifier les deux sous-espèces de *L. lactis* (*L. lactis* subsp. *lactis* et *L. lactis* subsp. *cremoris*) (Salama et al., 1991).

L'identification par PCR (Polymerase Chain Reaction) ou par PCR multiplex de *L. lactis* et de *L. garvieae* est possible avec l'aide d'amorces, i) ciblant l'ARNr 16S (Zlotkin et al., 1998; Pu et al., 2002), ii) exploitant le polymorphisme de la région intergénique ADNr 16S-23S (Blaiotta et al., 2002) iii) d'autres gènes fonctionnels comme l'opéron de biosynthèse de l'histidine par exemple (Delorme et al., 1992 et 1999) ou des gènes d'ACMA (The Major Lactococcal Cell Wall Autolysin) (Fihman et al., 2006).

La diversité génétique des *Lactococcus* a pu être analysée par RAPD (Randomly Amplified DNA Analyses) (Tailliez et al., 1998), par l'analyse de microsatellite par

l'Electrophorèse en Champ pulsé ou " Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) pour *L. garvieae* (Vela et al., 2000).

- Métabolisme

Les espèces *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ont un rôle majeur dans l'acidification des fromages par production d'acide lactique. Elles contribuent également à la texture par production d'exopolysaccharides et à la flaveur par production de composés aromatiques (alcools, aldéhydes, cétones) par la dégradation du citrate ou des acides gras (Engels et Visser, 1996). Dotées de protéases membranaires et de peptidases, elles sont capables de dégrader les protéines et les peptides (Monnet et al., 1993). Elles métabolisent également les acides aminés en composés aromatiques (aldéhydes, alcools, composés soufrés) (Bonnarme et al., 2004; Yvon, 2006). Elles peuvent aussi produire du diacétyle. Leurs potentialités métaboliques sont de plus en plus explicitées grâce à l'exploitation des séquences du génome disponibles (Kok et al., 2005).

Le métabolisme de *L. garvieae* n'a été que peu étudié. Seules ses caractéristiques biochimiques et physiologiques sont mentionnées dans la littérature dans un but taxonomique. Elle ne fermente pas le lactose, elle est capable de dégrader l'arginine (Vendrell et al., 2006).

- Prévalence des *Lactococcus* dans les produits

laitiers

Les *Lactococcus* sont présents dans le lait et pourraient essentiellement provenir des fourrages. Ils sont aussi dénombrés dans de nombreux produits laitiers dont les fromages. Dans ces produits, deux sous-espèces de *L. lactis* (*L. lactis* subsp. *cremoris* et *L. lactis* subsp. *lactis*) sont quantitativement importantes. Cogan et al. (1997) ont estimé que les souches identifiées à ces espèces peuvent représenter 38% des isolats de bactérie lactique identifiés dans des fromages européens. Elles sont largement utilisées comme ferment en fabrication fromagère, seule ou en association avec d'autres bactéries lactiques (Beresford et al., 2001). Elles peuvent se maintenir tout au long de la période d'affinage dans beaucoup de fromages au lait cru tels que le Camembert (Corroler et al., 1998), le Serra (Macedo et al., 1995), le Venaco (Casalta et al., 1997) et le Pecorino Sardo (Ledda et al., 1996). Leur niveau peut être supérieur

à 10^8 ufc/g dès les premiers jours de fabrication des fromages. *L. raffinolactis* n'est qu'occasionnellement isolé dans les laits et le fromage (Lopez – Diaz et al., 2000).

Lactococcus garvieae a été identifié dans des laits crus (Villani et al., 2001; Zamfir et al., 2006), dans différents fromage au lait cru; fromage AOC Salers (Callon et al., 2004), fromages égyptiens (El-Baradei et al., 2005), fromage de Jben (Ouadghiri et al., 2005) et de fromages italiens du Piemontese PDO Toma (Fortina et al., 2003).

- Innocuité

La plupart des espèces de *Lactococcus* sont considérées comme GRAS (Salminen et al., 1998). Cependant, *L. garvieae* n'a pas été reconnu sans risque. Il a été associé à des mammites (Teixeira et al., 1996), à des infections septicémiques des poissons dans l'aquaculture intensive (Kusuda et al., 1991; Avi Eldar et al., 1999; Vela et al., 2000). Les infections humaines à *L. garvieae* sont rares et touchent essentiellement des personnes âgées et immunodéprimées (Fefer et al., 1998), un cas de bactériémie avec des abcès du foie a été décrit (Mofredj et al., 2000). Les souches de *L. garvieae* pathogènes se distinguent des non pathogènes par leurs profils génomiques (Kawanishi et al., 2006).

I.1.2. Staphylocoques et bactéries corynéformes

Les bactéries non lactiques à Gram positif isolées de fromages appartiennent essentiellement aux groupes des staphylocoques et des bactéries corynéformes (Irlinger, 2000). Le tableau 1 recense les principales espèces de bactéries non lactiques à Gram positif isolées de lait et de fromages. Les bactéries appartenant à ces deux groupes ont des propriétés physiologiques qui leur permettent de se développer à la surface des fromages ; elles sont aérobies, alcalinophiles, mésophiles, tolérantes aux fortes concentrations en sel et ne peuvent croître en condition acide (Irlinger, 2005). Elles ont un rôle important dans la production de molécules aromatiques dans les fromages. En effet, outre leurs activités protéolytiques et lipolytiques, les espèces de bactéries corynébactéries sont capables de dégrader les acides aminés en composés volatils aromatiques alcools, composés soufrés, composés carbonylés et de produire des esters (Irlinger, 2005).

Les caractéristiques du genre *Staphylococcus* seront développées dans le paragraphe II.

I.1.3. Les levures et moisissures

Les levures présentes dans l'eau, l'air, le sol et les plantes peuvent se retrouver dans le lait et les fromages (Gueguen et Schmidt, 1992). Les espèces les plus fréquemment isolées des produits laitiers sont indiquées dans le tableau 1. Les concentrations en cellules viables de levures sont 100 à 1000 fois plus importantes sur la croûte qu'à cœur du fromage (Leclercq-Perlat et al., 1999). Les levures sont dotées d'une activité protéolytique et aromatisante. Elles métabolisent le lactate, provoquant une augmentation des valeurs de pH, et peuvent sécréter des facteurs qui favorisent la croissance de *B. linens* dans les fromages Limburger et Tilsit (Fleet, 1990), et de *Penicillium roquefortii* dans les fromages à pâte persillée. Les levures peuvent également participer à l'ouverture de ces derniers par formation de gaz (Coghill et Juffs, 1979). Elles jouent un rôle essentiel dans la production d'arômes par la production d'une grande variété de composés volatils (Molimard et Spinnler, 1996). Dans le Camembert, les levures inhibent la croissance des moisissures indésirables. Certaines moisissures ont un intérêt technologique. Sur la croûte du Camembert et du Brie, *Penicillium camembertii* forme un feutrage blanc, et dans la pâte des « bleus » *Penicillium roquefortii* crée un aspect persillé. En fromage Saint-Nectaire, *Cylindrocarpon heteronema* est responsable du feutrage blanc ou rosé de la croûte (Ratomahenina et al., 1995).

Les levures et les moisissures contribuent à la neutralisation de la pâte en métabolisant l'acide lactique en CO₂ et H₂O. La désacidification de la surface crée un gradient de pH de la surface vers l'intérieur.

I.1.4. Les bactéries à Gram négatif

Les espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* sont les plus fréquemment rencontrées dans les fromages. Elles peuvent atteindre 10⁶, 10⁷ ufc/g en début d'affinage mais décroissent ensuite (Tornadijo et al., 2001). Les espèces *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Buttiauxella agrestis* ont été isolées des fromages San Simon (Tornadijo et al., 2001) et Camembert (Ogier et al., 2002).

Les espèces du genre *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*) sont également fréquentes dans les fromages.

Tableau 2 : Critères microbiologiques des fromages au lait cru (Directives paquet hygiène N° 852 et 853-2004)

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plans d'échantillonnage ¹		Limites ²		Méthode d'analyse de référence ³	Stade d'application du critère
		n	c	m	M		
Fromages au lait cru	Staphylocoques à coagulase positive	5	2	10 ⁴ ufc/g	10 ⁵ ufc/g	EN/ISO 6888-2	Pendant le processus de fabrication, au moment où l'on prévoit le nombre de <i>S. aureus</i> le plus élevé
	Entérotoxines staphylococciques	5	0	Pas de détection dans 25 g (m=M)		Méthode européenne de dépistage du LCR pour le lait ⁸	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Fromages, beurre et crème fabriqués à partir de lait cru ou de lait traité à une température inférieure à celle de la pasteurisation ⁷	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g (m=M)		EN/ISO 6579	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
Denrées alimentaires prêtes à consommer pouvant favoriser le développement de <i>L. monocytogenes</i> , autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g ⁴ (m=M)		EN/ISO 11290-2 ⁵	Produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation
	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Absence dans 25 g ⁶ (m=M)		EN/ISO 11290-1	Avant que l'opérateur produise cette denrée alimentaire n'en perde la maîtrise immédiate

¹ n = nombre d'unités constituant l'échantillon; c = nombre d'unités d'échantillonnage donnant des valeurs supérieures à m ou comprises entre m et M.

² m: norme (nombre par gramme), M: seuil de tolérance supérieur (nombre par gramme).

³ Il y a lieu d'utiliser l'édition la plus récente de la norme.

⁴ Ce critère est applicable lorsque le fabricant est en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant la durée de conservation. L'exploitant peut fixer, pendant le processus, des valeurs suffisamment basses pour garantir que la limite de 100 ufc ne sera pas dépassée au terme de la durée de conservation.

⁵ 1 ml d'inoculum est déposé sur une boîte de Petri d'un diamètre de 140 mm ou sur trois boîtes de Petri d'un diamètre de 90 mm.

⁶ Ce critère est applicable aux produits avant qu'ils n'échappent à la maîtrise immédiate de l'exploitant du secteur alimentaire, lorsque celui-ci n'est pas en mesure de démontrer, à la satisfaction de l'autorité compétente, que le produit respectera la limite de 100 ufc/g pendant toute la durée de conservation.

⁷ Excepté les produits pour lesquels le fabricant peut démontrer, à la satisfaction des autorités compétentes qu'en raison du temps d'affinage et de la valeur a_w du produit, il n'y a aucun risque de contamination par les salmonelles.

⁸ Référence: Hennekinne et al., J. AOAC Internat. Vol. 86, No 2, 2003.

Les espèces appartenant au groupe des bactéries à Gram négatif, de par leurs fortes activités protéolytiques et lipolytiques peuvent être responsables d'altération lorsqu'elles sont dominantes dans les fromages (Sorhaug et Stepaniak, 1997). Elles peuvent présenter un risque pour la santé par leur capacité à produire des amines (Marino et al., 2000).

I.2. Les microorganismes pathogènes du lait et du fromage

Les microorganismes pathogènes du lait et du fromage sont des microorganismes pour la plupart ubiquitaires qui peuvent être responsables de toxi-infections alimentaires ou d'intoxications (intoxication sans infection). Dans les fromages, les microorganismes potentiellement pathogènes qui sont soumis à des normes réglementaires sont *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* en raison de la possible production d'entérotoxines. Les normes européennes concernant ces microorganismes dans les fromages au lait cru sont présentées dans le tableau 2.

I.2.1. Salmonella

Les *Salmonella* appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries à Gram négatif, anaérobies facultatives, capables de se multiplier à des températures comprises entre 5 et 45°C et à des valeurs de pH de 4,5 à 9. Elles sont à l'origine de salmonellose qui est l'une des toxi-infections alimentaires les plus courantes et les plus répandues.

I.2.2. Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes est un bacille (0,4 à 0,5 µm de diamètre et 0,5 à 2µm de longueur) à Gram positif, non sporulé et non capsulé, aérobie-anaérobie facultative. Elle est catalase positive et oxydase négative.

L. monocytogenes est un pathogène pour l'homme et les animaux. La listériose atteint préférentiellement les personnes dont le système immunitaire est déficient, les femmes enceintes, les nouveaux-nés et les personnes âgées (Vazquez-Boland et al., 2001). C'est une maladie rare avec une incidence en 1996 de 0,43 cas pour 100000 habitants (données de l'Institut national de Veille Sanitaire) mais dont les conséquences sont graves. En 2005, 280 listérioses ont été recensées en France.

Tableau 3: Caractères distinguant les différents genres de la famille des *Staphylococcaceae* (Ventosa et al., 1990, Kloos et al., 1998, Freney et al., 1999, Yoon et al., 2003)

Caractères	<i>Staphylococcaceae</i>				
	<i>Macrococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Gemella</i>	<i>Salinicoccus</i>	<i>Jeotgalicoccus</i>
Croissance anaérobie	+	+	-	-	+
G+C% de l'ADN	38 - 45	30 - 40	ND	46 - 59	42
Test d'oxydase	+	-*	-	+	+
Test de catalase	+	+***	-	+	+
Taille de cellules µm	1,1 - 2,5	0,5 - 1,1	ND	ND	0,6 - 1,1
Taille des de restriction d'ADN génomique par SmaI	1500 - 1800	2200 - 2700	ND	ND	ND
Sensibilité à la bacitracine	-	+	ND	ND	ND
Acides teichoïques dans la paroi	-**	+	ND	ND	ND

+ = test positif, - = teste négatif, ND = non déterminé

* = test négatif sauf pour les espèces (*S. fleurettii*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. vitulinus*)

** = présence d'acide teichoïque atypique chez *Macrococcus caseolyticus*

***= test positif sauf pour les espèces *S. aureus* subsp *anaerobius* et *S. saccharolyticus*

II. Le genre *Staphylococcus*

II.1. *Staphylococcus aureus* au sein du genre *Staphylococcus*: Taxonomie

Le genre *Staphylococcus* appartient à la famille des *Staphylococcaceae* dans laquelle sont également inclus les genres *Macrococcus*, *Gemella*, *Jeotgalicoccus* et *Salinicoccus* (cf. Tableau 3) (Garrity et Holt, 2001). Phylogénétiquement, il est relié à la branche "*Clostridium*, *Bacillus*, *Streptococcus*" (Stackebrandt et al., 1997). L'appartenance de ces deux derniers genres à cette famille est surprenante compte tenu de leur haut pourcentage de G+C et leur classification sera probablement revue. La taxonomie du genre *Staphylococcus* a évolué ces dernières années en particulier grâce au développement du séquençage d'ARNr 16S. Quarante espèces de *Staphylococcus* ont été inventoriées dont 24 sous-espèces comme il est indiqué dans le tableau 4. Elles sont séparées en deux groupes sur la base de la présence de coagulase.

Le groupe des *Staphylococcus* à coagulase négative avec 33 espèces est le plus important et ne présente pas de risque sanitaire majeur. La plupart des espèces de ce groupe ont un intérêt dans l'élaboration des caractéristiques sensorielles des saucissons et des fromages (Morea et al., 1999; Blaiotta et al., 2004). *Staphylococcus equorum* est l'espèce la plus fréquente dans les fromages (Place et al., 2003) mais d'autres espèces telles que *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus vitulinus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus fleurettii* et *Staphylococcus sciuri* ont aussi été isolées de lait ou de fromage (Vernozy-Rozand et al., 2000; Garcia et al., 2002). Les espèces résistantes au sel et aux acides contribueraient à la formation de l'arôme des fromages. D'autres espèces telles que *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* et *Staphylococcus lugdunensis* sont peu virulentes mais peuvent être impliquées dans des infections nosocomiales (Grundmann et al., 2002).

Le groupe des *Staphylococcus* à coagulase positive est constitué de 7 espèces identifiées à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus pseudintermedius* et *Staphylococcus schleiferi*. Celles-ci peuvent être impliquées dans des infections humaines.

Tableau 4 : Espèces de *Staphylococcus* selon www.bacterio.cict.fr

Espèce	Présence en produit alimentaire	Risque ou intérêt
<i>Staphylococcus</i> coagulase positive		
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>		} Pathogène
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Lait, fromage, viande	
<i>S. delphini</i>	Lait	
<i>S. hyicus</i> subsp. <i>chromogenes</i>	Lait	
<i>S. hyicus</i> subsp. <i>hyicus</i>	Lait	
<i>S. intermedius</i>	Lait, fromage, viande	
<i>S. lutrae</i>		
<i>S. pseudintermedius</i>		
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Lait	
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i>	Lait	
<i>Staphylococcus</i> coagulase négative		
<i>S. arlettae</i>	Lait	
<i>S. auricularis</i>	Lait, fromage, viande	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i>	Lait, viande	
<i>S. capitis</i> subsp. <i>urealyticus</i>	Lait	
<i>S. caprae</i>	Lait, viande	
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i>	Saucisson, Mozzarella	Ferment
<i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i>		
<i>S. caseolyticus</i>	Lait, fromage	
<i>S. chromogenes</i>	Lait	
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i>	Lait, fromage	
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>		
<i>S. condimenti</i>		
<i>S. epidermidis</i>	Lait, fromage, saucisson	
<i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i>	Lait, fromage saucisson	Ferment
<i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i>	Lait, fromage	
<i>S. felis</i>		
<i>S. fleurettii</i>	Lait, fromage	
<i>S. gallinarum</i>	Fromage	
<i>S. haemolyticus</i>	Lait, viande	
<i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	Lait	
<i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i>		
<i>S. kloosii</i>		
<i>S. lentus</i>	Lait, fromage	
<i>S. lugdunensis</i>	Lait	
<i>S. muscae</i>		
<i>S. nepalensis</i>		
<i>S. pasteurii</i>	Saucisson	
<i>S. piscifermentans</i>	Poisson	
<i>S. pulvereri</i>	Saucisson	
<i>S. saccharolyticus</i>		
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i>		
<i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i>	Lait, fromage, saucisson	
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i>	Lait, fromage	
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>lentus</i>	Lait	
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i>		
<i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i>	Lait	
<i>S. simiae</i>		
<i>S. simulans</i>	Lait	
<i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i>		
<i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i>	Saucisson	
<i>S. vitulinus</i>	Saucisson	
<i>S. warneri</i>	Lait, saucisson	
<i>S. xylosus</i>	Lait, fromage, viande, saucisson	Ferment

Tableau 5: Principaux caractères permettant de différencier les espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus* produisant ou pouvant produire une coagulase. D'après Fuente et al. (1985); Freney et al. (1999) et Devriese et al. (2005).

	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	<i>S. delphini</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. lutrae</i>	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>
Catalase	+	-	+	+	+	+	+	+
Clumping factor	+	-	-	-	d	-	-	-
Croissance en aérobiose	+	-	+	+	+	+	+	+
Pigmentation possible des colonies	+	-	-	-	-	-	-	-
Réduction des nitrates	+	-	+	+	+	+	+	+
DNase thermostable	+	+	-	+	+	+	+	+
Hyaluronidase	+	+	Nd	+	-	-	Nd	-
Hémolyse	+	+	+	-	d	+	+	+
Production d' acétyl-méthyl-carbinol , test (VP)	+	-	-	-	-	-	+	+
Bêta-galactosidase	-	-	-	-	+	+	+	d
Pyrrolidonyl arylamidase	-	Nd	-	-	+	Nd	+	Nd
D-galactose*	+	-	Nd	+	+	+	+	+
D-mannitol*	+	-	+	-	d	+	+	d
Saccharose*	+	+	+	-	+	Nd	+	Nd
D-tréhalose*	+	-	-	+	+	+	+	-
D-ribose*	+	-	-	+	+	+	+	+
D-xylose*	-	-	-	-	-	+	-	-
Résistance à 8 µg/mL d'acriflavine	+	Nd	-	-	-	-	-	-
Résistance à la polymyxine B	+	Nd	-	+	-	-	-	-

+ :>90% des souches positives ; - :> 90% des souches négatives; d= entre 11 et 89% des souches sont positives, Nd = non déterminé.

*=Acidification en aérobiose.

Tableau 6 : Amorces spécifiques pour l'identification d'espèces de *Staphylococcus* coagulase positive

Espèce	Gene	Primer	Taille	Oligonucleotide séquence 5'→3'	Position	Référence
<i>S. aureus</i>	<i>nucA</i>	Pri-1	21	GCGATTGATGGTGATACGGTT	48-70	Brakstad et al., 1992
		Pri-2	24	AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	303-328	
	<i>gap</i>	Sa442-1	30	AATCTTTGTTCGGTACACGATATTCTTCACG	5-34	Martineau et al., 1998
		Sa442-2	30	CGTAATGAGATTTTCAGTAGATAATACAACA	83-112	
		GF-1	26	ATGGTTTTGGTAGAATTGGTCGTTTA	22-47	Yugueros et al., 2001
		GR-2	25	GACATTTTCGTTATCATACCAAGCTG	956-932	
		JIRS-2	20	AAAAACACTTGTTCGATATGG	655-1480	Stepan et al., 2001
		JIRS-1	19	GTTTCAATACATCAACTGC		
<i>S. hyicus</i>	<i>sodA</i>	STAH-SodI	23	GCTTATCGCGAATGTTGACCAAT		Voytenko et al., 2006
		STAH-SodII	22	TCGTGCTGCTGCTTTATCTGAG		
	16S-23S	STAH-HYI	19	TACGGAATATCGCCTTACG		Forsman et al., 1997
	ISR	STAH-HYII	20	AAAACATCTGTCATCCGAAG		
<i>S. intermedius</i>	<i>nuc</i>	nucIH1	20	CCTGCAATGAGAGGTAAGTT	254-273	Becker et al., 2005
		nucSI2	21	CAGACATTCAATATGCGATTC	1166-1186	
		nucSI3B	24	TGACGCTTATAGTTAGGATTACAT	430-453	

II.2. Méthodes d'identification des espèces du genre *Staphylococcus* dont *S. aureus*

II.2.1. Identification au niveau espèce

Les espèces de ce genre sont des coques en amas (grappe de raisins), à coloration de Gram positive, oxydase positive, catalase positive sauf *S. aureus* subsp. *anaerobius* et *S. saccharolyticus* (Freney et al., 1999). Le contenu en Guanine (G) et Cytosine (C) de leur ADN est entre 30 et 40%. Leur paroi contient des acides teichoïques et des résidus glycine dans la structure de leur peptidoglycane. Les espèces de *Staphylococcus* sont résistantes au lysozyme et sensibles à la lysostaphine. Les espèces du genre ne possèdent pas de cytochromes C et D.

Les caractères phénotypiques (cf. Tableau 5) ont longtemps été les seuls critères utilisés pour identifier ces espèces mais la variabilité dans l'expression de certains caractères rend l'identification parfois difficile (Irlinger et al., 1997, Ligozzi et al., 2002). D'autres critères tels que l'analyse d'enzymes ou la composition d'acides gras peuvent être également être pris en compte (Devriese et al., 1983 et 1984; Isigidi et al., 1990). En 2007, les méthodes génomiques ont remplacé les autres méthodes (Reinoso et al., 2006). Elles reposent sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S (Krimmer et al., 1999; Nakano et al., 2004), du gène *rpoB* (Drancourt et Raoult, 2002), du gène *tuf* (Tow et Cowan, 2003), du gène codant la protéine *HSP60* (Heat Shock Protein) (Kwok et Chow, 2003), du gène *sod* (Poyart et al., 1995).

Des primers spécifiques sont disponibles pour identifier par PCR certaines espèces de *Staphylococcus* (Forsman et al., 1997; Martineau et al., 1998; Becker et al., 2005). Le tableau 6 recense les primers spécifiques pour l'identification de *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. intermedius*. *S. aureus* peut être identifié par des primers spécifiques ciblant le gène *coa* ou le gène *gap*, tandis que *S. intermedius* par ceux ciblant le gène *nuc* (Da Silva et al., 2006).

Les espèces de *Staphylococcus* d'origine clinique ou alimentaire peuvent être rapidement identifiées par PCR multiplex (Ramesh et al., 2002; Cremonesi et al., 2005). La méthode IRTF (Infrarouge à Transformation de Fourier) est une méthode fiable et rapide pour l'identification de *S. aureus* parmi les autres espèces de *Staphylococcus* (Lamprell et al., 2006).

Tableau 7: Biotype de *Staphylococcus aureus* selon Hajek et Marsalek, (1971), Devriese, (1984) et Isigidi et al., (1990)

Biotype	Staphylokinase	β hémolyse	Coagulation du plasma de bovin en 6 h	Croissance sur cristal violet
Humain	+	-	-	-
Humain β positif	+	+	-	-
Volaille	-	-	-	+
Bovin	-	+	+	+
Ovin	-	+	+	-
Abattoir	-	-	-	+
Lièvre	-	+	-	-
Chien	-	+	+	+
Pigeon	-	+	+	+
Biotype non spécifique				
K- β +CVC	-	+	-	-
K- β +CVA	-	+	-	+
K+ β -CVA	+	-	-	+
K+ β +CVA	+	+	-	+
K- β -CVC	-	-	-	-

+ = > 80% des souches positives; - = > 80% des souches négatives, Cristal violet + = croissance avec couleur jaune - = croissance avec couleur bleu ou violet.

II.2.2. Typage des souches de S. aureus

Le typage des souches de *S. aureus* est possible par biotypage. Ainsi les souches de *S. aureus* d'origine humaine ou animale ont été différenciées en 8 biotypes spécifiques humains, volaille, bovin, ovin, abattoir, lièvre, chien et pigeon plus 5 biotypes non spécifiques (cf. Tableau 7). L'analyse de la sensibilité aux antibiotiques (Place et al., 2003), la détermination du sérotype (Tierno et Stotzky, 1978), l'analyse de profils protéiques et l'analyse génomique (Pantucek et al., 1996) permettent également de distinguer les souches au sein d'une espèce. La méthode d'Electrophorèse en Champ pulsé ou " Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) sur l'ADN chromosomique est une méthode fiable car les profils de restriction sont reproductibles (Zadoks et al., 2002; Hennekinne et al., 2003; Vautor et al., 2003). Elle est plus performante que la technique RAPD (Randomly Amplified DNA Analyses) (Grundmann et al., 2002; Rodriguez-Calleja et al., 2006).

Ces méthodes de typage sont utilisées pour retracer l'origine de contamination dans la production de lait et fromages comme nous le détaillerons dans le paragraphe II.6.

L'analyse des nombres variables des tandems répétés "Variable Number Tandem Repeat" (VNTR) du génome s'avère être une méthode de typage très performante et plus discriminante que les méthodes précédentes. Le nombre d'unités de répétition sur le génome peut être détecté avec des amorces PCR. Le génome de *S. aureus* contient plusieurs sites VNTR (François et al., 2005) comme le facteur A (ClfA) (Clumping factor A), le facteur B (ClfB) (Clumping factor B) et des protéines fibronectines (fna, fnb) (Sabat et al., 2003; Urwin et Maiden 2003).

II.2.3. Dénombrement des Staphylococcus à coagulase positive

Le milieu sélectif Baird-Parker avec plasma de lapin et fibrinogène (RPFA) (Rabbit Plasma Fibrinogen Agar) est le milieu de référence pour dénombrer les *Staphylococcus* à coagulase positive dans les laits et les produits laitiers (De Buyser et al., 2003). Sur ce milieu, les colonies de *Staphylococcus aureus* apparaissent avec une couleur noire et un halo. Ce halo résulte de la formation d'une staphylothrombine qui agit en coupant les fibrinopeptidases A et B du fibrinogène du plasma de lapin, ce qui entraîne un processus de polymérisation, se traduisant par l'apparition de fibrine (halo) autour des colonies.

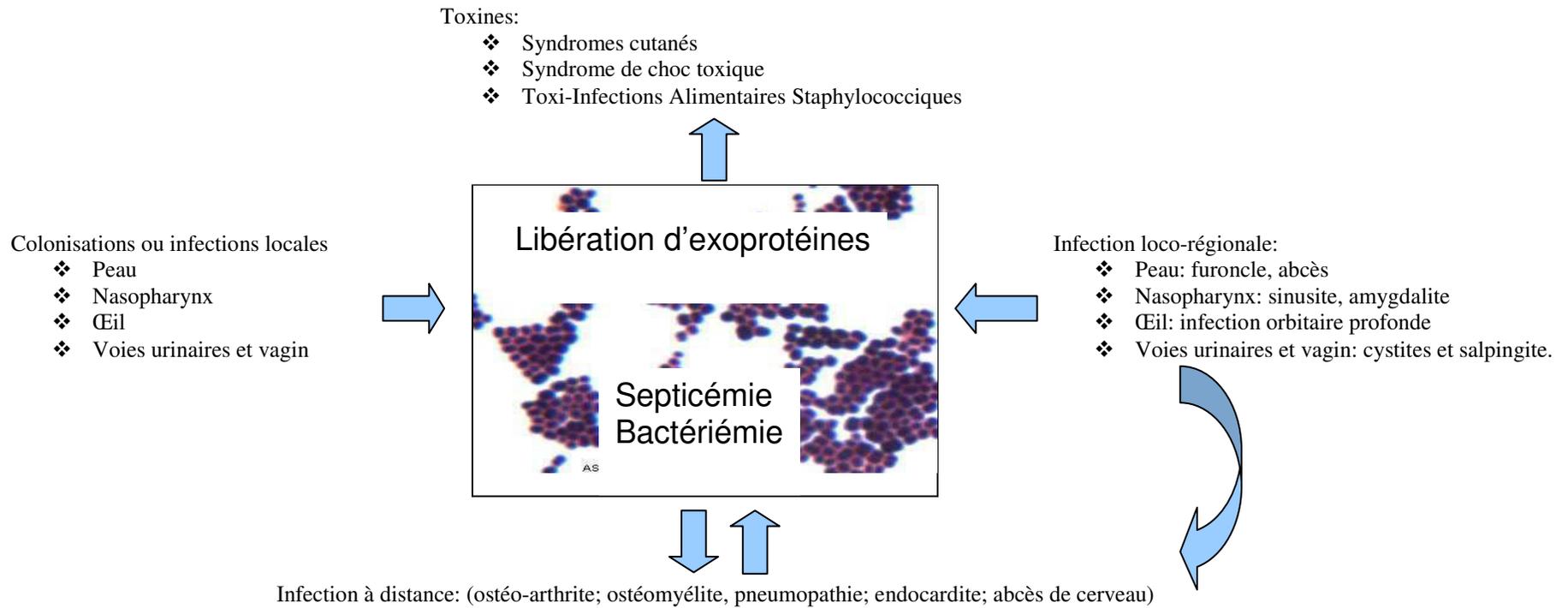


Figure 1: Implication de *S. aureus* en pathologie humaine

II.3. Habitat de *S. aureus*

Les espèces du genre *Staphylococcus* sont très ubiquitaires. Les espèces de *Staphylococcus* sont présentes sur la peau et les muqueuses des animaux à sang chaud et des humains, le sol, l'air et l'eau. Elles font partie des communautés microbiennes des laits, des produits fermentés, des fromages et des produits de salaison. La majorité des humains sont porteurs sains de *S. aureus* (Leyden et al., 1974) et les fosses nasales, les mains et la peau en sont des réservoirs importants (Nagase et al., 2001). Les peaux des mamelles et des trayons des animaux sont contaminés par *S. aureus* (Matos et al., 1991; Zadoks et al., 2002).

II.4. Toxicité de *S. aureus*

S. aureus peut être la cause de différentes infections chez l'homme (cf. Figure 1). Il est impliqué dans des infections cutanées plus ou moins localisées. Les infections à *S. aureus* les plus fréquentes sont les infections cutanées de muqueuses telles que les abcès. Parfois, ces infections se compliquent par extension loco-régionale de l'infection, ou par diffusion hématogène de la bactérie. *S. aureus* peut être responsable d'endocardites, de septicémies, de pneumopathies, d'ostéomyélites, d'arthrites, d'infections urinaires ou de méningites. Il est responsable d'infections nosocomiales (Grundmann et al., 2002) et sa résistance aux antibiotiques en particulier à la méthicilline est une préoccupation majeure. Sa virulence est liée à la production d'enzymes (cf. Tableau 8), de toxines, à la présence de protéines de surface (adhésions), de protéines de liaison au fibrinogène et à sa capacité à former des biofilms par production d'exopolysaccharide (Fox et al., 2005; Oliveira et al., 2006). Ainsi, *S. aureus* est capable de synthétiser de nombreuses toxines (cf. Tableau 9) à l'origine de plusieurs infections spécifiques et de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC).

II.4.1. Infections spécifiques liées aux toxines de *S. aureus*

L'exfoliation cutanée chez le jeune enfant est due à deux types de toxine, les exfoliatines A et B (Floret, 2001; Ladhani, 2003; El Helali et al., 2005). La forme staphylococcique de la scarlatine est liée à la production de l'entérotoxine TSST (Toxic Shock Syndrome Toxin). Cette entérotoxine est aussi responsable du syndrome

Tableau 8 : Principaux facteurs de virulence de *S. aureus* (D'après Novick, 2003)

Facteurs de virulence	Propriétés-Fonction
Toxines	
Hémolysines α , β , γ , δ	Action sur la membrane cellulaire. Effet cytotoxique et/ou cytolitique
Leucocidine Panton-Valentin	Action lytique sur les leucocytes; induction de nécrose cellulaire
Exfoliatine A et B	Epidermolyse; activité mitogène sur les lymphocytesT; responsables de staphylococcies cutanées bulleuses.
Toxine du syndrome du choc toxique (TSST)	Activité superantigénique, responsable du syndrome du choc toxique
Entérotoxines A-E (SEA-SEE)*	Activité superantigénique et émétique; impliquées dans les intoxications alimentaires
Enzymes	
Coagulase libre	Coagulation du plasma, rôle protecteur contre la phagocytose
Fatty Acid Modify Enzyme (FAME)	Estérification des acides gras
Lipase/estérase	Hydrolyse des lipides- rôle nutritionnel
Staphylokinase	Active le plasminogène en plasmine et provoque la lyse de la fibrine
Nucléases	5'-phosphodiesterase exo et endonucléasique active sur les acides nucléiques; rôle nutritionnel
Hyaluronidase	Lyse des tissus conjonctifs; diffusion tissulaire de <i>S. aureus</i>
PI-phospholipase C	Activité lipasique
Staphopaine	Cystéine protéase
Cystéine protéase	Activité protéasique
Composés de surface	
Protéine A	Fixe le fragment Fc des immunoglobulines; résistance à la phagocytose
Fibronectin binding protein A et B	Liaison à la fibronectine; adhésion et colonisation
Protéine de liaison au fibrinogène	Fixation au fibrinogène; adhésion colonisation
Protéine de liaison au collagène	Fixation au collagène; colonisation
Clumping factors A et B	Fixation au fibrinogène; colonisation
Capsule polysaccharide type 5 et 8	Lutte contre phagocytose

*Les entérotoxines sont détaillées dans le tableau 9

de choc toxique caractérisé par de la fièvre, des vomissements, des diarrhées, de l'hypotension et une langue framboisée.

La production de Leucocidine de Pantone Valentine (LPV) par *S. aureus* est à l'origine d'infections cutanées, en particulier de furoncles mais aussi de pneumopathie nécrosante. La pneumonie nécrosante touche principalement l'adolescent et le jeune adulte (Floret, 2001). La toxine LPV serait aussi impliquée dans l'inflammation des mamelles des animaux (Zecconi et al., 2006).

II.4.2. Toxi- infection alimentaire

Les Toxi-Infections Alimentaires (TIA) peuvent être occasionnées par l'ingestion d'aliments contenant des entérotoxines staphylococciques produites par certaines souches de *S. aureus* ou occasionnellement par d'autres espèces de *Staphylococcus* comme *S. intermedius* (Khambaty et al., 1994) ou des espèces de *Staphylococcus* coagulase négative comme *S. simulans*, *S. equorum*, *S. lentus* et *S. capitis* (Bautista et al., 1988; Vernozy-Rozand et al., 1996).

Les symptômes d'intoxication apparaissent très rapidement après l'ingestion (1-6 h) et se traduisent par des vomissements, des diarrhées et des douleurs d'estomac. Une Toxi-infection Alimentaire Collective (TIAC) est suspectée si plus d'une personne présente les symptômes. La fréquence des TIAC due à *S. aureus* est difficile à évaluer. D'après les données de Haeghebaert et al. (2002), 16% des TIAC déclarées seraient dues à *S. aureus* sans causer de décès. Les *Salmonella* et *Clostridium perfringens* et d'autres agents peuvent également être impliqués.

II.4.2.1 Caractéristiques des entérotoxines staphylococciques

En 2007, selon la taxonomie de Lina et al. (2004), il existe huit entérotoxines à activité émétique nommées de SEA à SEI et dix " Staphylococcal Enterotoxins like " (SEI) nommées SEIJ à SEIR et SEIU sans activité émétique et sans rôle démontré dans les infections alimentaires (Balaban et Rasooly, 2000; Orwin et al., 2001; Le Loir et al., 2003; Lina et al., 2004; Omoe et al., 2005; Lawrynowicz-Paciorek et al., 2007). Elles agissent soit comme des toxines gastro-intestinales, soit comme des superantigènes qui stimulent la production des cellules T non spécifiques. Les deux fonctions seraient fortement corrélées à deux domaines différents des protéines.

Tbleau 9 : Entérotoxines staphylococciques; propriétés biochimiques et biologiques. Autres références; Balaban et Rasooly 2000; Le loir et al., 2003; Lina et al., 2004; Lawrynowicz-Paciorek et al., 2007.

Entérotoxine SE ou Entérotoxine like SEI	Gène	Position du gène	Taille du gène (bp)	contrôle par agr	Nombre d'acide aminé (aa)	Masse moléculaire (kDa)	pI	activité émétique	Référence
SEA	sea	Prophage	774	non	233	27,1	7,3	oui	Betley et Mekalanos 1985; Borst et Betley 1994
SEB	sab	Chromosome, plasmide, transposon	801	oui	239	28,336	8,6	oui	Shafer et Iandolo 1978
SEC1	sec1	Plasmide	801	oui	239	27,531	8,6	oui	Altboum et al. 1985; Bohach and Sclievert 1987
SEC2			801	oui	239	27,531	7,8	oui	Bohach and Sclievert 1989
SEC3			801	oui	239	27,563	8,1	oui	Hovde et al. 1990
SED	sed	Plasmide (pIB485)	777	oui	228	26,36	7,4	oui	Bayles and Iandolo 1989;
SEE	see	Défectif phage	774	non	230	26,425	7	oui	Couch et al. 1988
SEG	seg	Enterotoxin gène cluster (egc), chromosome	777	±	233	27,043	5,7	oui	Munson et al. 1998; Jarraud et al. 2001
SEH	seh	Chromosome	726	ND	218	25,21	ND	oui	Su et Wong 1995; Letertre et al. 2003
SEI	sei	egc, chromosome	729	non	218	24,928	ND	oui	Munson et al. 1998; Jarraud et al. 2001
SEIJ	sej	Plasmide (pIB485)	806	non	245	28,565	8,65	ND	Zhang et al. 1998
SEIK	sek	Ilot de pathogénicité	729	ND	219	25,539	6,5	non	Orwin et al. 2001
SEIL	sel	Ilot de pathogénicité	723	ND	215	24,593	8,66	non	Fitzgerald et al. 2001,
SEIM	sem	egc, chromosome	722	ND	217	24,842	6,24	ND	Jarraud et al. 2001
SEIN	sen	egc, chromosome	720	ND	227	26,067	6,97	non	Jarraud et al. 2001
SEIO	seo	egc, chromosome	783	ND	232	26,777	6,55	non	Jarraud et al. 2001
SEIP	sep	Prophage	-	ND	-	-	ND	ND	Omoe et al. 2005
SEIQ	seq	Ilot de pathogénicité	-	ND	-	-	ND	non	Omoe et al. 2005
SEIR	ser	Deux plasmides	899	±	259	27,049	ND	ND	Omoe et al. 2003
SEIU	seu	egc	-	ND	-	-	ND	ND	Letertre et al. 2003

ND= non déterminé; ± = présence de relation mais n'est pas confirmé avec l'accessory gène regulator (agr); egc= Entérotoxine gène cluster

Les toxines les plus fréquemment identifiées dans les TIA sont SEA (71% des TIA aux USA), SED (37,5%) et SEB (10%) (Casman et Bennett, 1965).

Les entérotoxines peuvent engendrer des symptômes à des concentrations très faibles de l'ordre de 100 ng de SEA chez l'homme (Evenson et al., 1988) mais le niveau de toxicité est variable selon les individus. Ce sont des exoprotéines de bas poids moléculaire (de 27 à 30 Kdaltons) secrétées dans les milieux et solubles dans l'eau et les solutions salines. Elles résistent à l'action des enzymes protéolytiques (pepsine, trypsine) et sont stables à la chaleur (Bergdoll, 1983). Même si elles sont inactivées par un chauffage en milieu acide, elles peuvent parfois conserver une activité biologique. Les supports génétiques des entérotoxines, leur régulation ou non par le système "Accessory Gene Regulator" (agr), leurs masses moléculaires, leurs points isométriques et leur activité émétique sont résumés dans le tableau 9.

Sur la base d'homologie de leur séquence en acides aminés, les toxines SEA, SEE et SED seraient assez proches avec un pourcentage d'homologie respectivement de 83 et 50%. SEB et SEC présentent aussi 68% d'homologie de séquence, les entérotoxines SEIJ et SED sont homologues à 63% et SEIL et SEIO à 57%. SEG et SEI ont 37 à 40% d'homologie avec SEB et SEC, 26 à 28% d'homologie avec SEA, SED et SEE, et 21% d'homologie avec SEH (Balaban et Rasooly, 2000; Le Loir et al., 2003). SEI est phylogénétiquement proche de SEA et toutes deux ont des structures et des activités similaires (Balaban et Rasooly, 2000; Le Loir et al., 2003). La séquence de SEJ est proche de celles de SEA, SEE et SED (64 à 66%) (Balaban et Rasooly, 2000; Le Loir et al., 2003).

II.4.2.2. Détection des entérotoxines staphylococciques

Les entérotoxines staphylococciques peuvent être détectées par quatre types de méthodes:

1. Méthode de mesure de l'activité émétique sur animaux: c'est une méthode peu sensible et peu spécifique.
2. Méthodes moléculaires par la détection de gènes codant les entérotoxines par PCR. Elles ne fournissent pas d'information sur l'expression de ces gènes et la quantité d'entérotoxines produites dans une matrice.

3. Méthodes physicochimiques reposant essentiellement sur la chromatographie liquide haute performance couplée au spectromètre de masse. Elles sont peu utilisées car difficiles à mettre en œuvre.

4. Méthodes immunologiques basées sur l'utilisation d'anticorps anti-entérotoxines par diverses méthodes. La méthode de diffusion en gélose, peu sensible (100 ng/ml d'extrait) est peu utilisée. Les méthodes radio-immunologiques, malgré leur bonne sensibilité (1 ng/g aliment) du fait de la manipulation de radioéléments ne sont pas applicables en routine. L'agglutination passive sur billes de latex sur lesquelles ont été fixés des anticorps spécifiques anti-entérotoxines. L'agglutination en présence d'entérotoxines permet une quantification de l'ordre du ng. Les méthodes immunologiques de type ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) ou l'ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay).

Les entérotoxines SEA, SEB, SEC et SED peuvent ainsi être quantifiées par un test ELISA spécifique avec un seuil de détection inférieur à 0,1 ng d'entérotoxine/g de matrice (Lapeyre et al., 1987). Il existe plusieurs kits de détection (Lapeyre et al., 1996). La détection passe par une extraction préalable des entérotoxines de la matrice et leur concentration par dialyse. Malgré leurs limites, en particulier la détection de faux positif en raison d'interférence avec des protéines de *S. aureus*, le kit Transia plate et le kit VIDAS Staph enterotoxin II sont préconisés comme méthode officielle par la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL). Le kit Transia utilise la technique ELISA sandwich qui emploie un mélange d'anticorps mono- et polyclonaux pour la détection de SEA à SEE (Lapeyre et al., 1996 ; Pimbley et Patel, 1998), mais n'identifie pas les entérotoxines individuellement (Brett, 1998). Le kit VIDAS Staph enterotoxin II utilise la technique ELFA qui emploie des anticorps monoclonaux spécifiques des entérotoxines de Staphylocoques. La méthode officielle préconisée par l'Agence Française de la Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) comporte une phase de dialyse/concentration puis l'utilisation obligatoirement de l'un des deux kits (Transia ou VIDAS).

II.5. Maîtrise de *S. aureus*: croissance et production d'entérotoxines

La croissance de *S. aureus* et sa production d'entérotoxines sont dépendantes de facteurs biotiques et abiotiques au sein de l'écosystème fromage.

II.5.1. Effet des facteurs abiotiques

II.5.1.1. Effet de la température

La gamme de température pour la croissance de *S. aureus* s'étend entre 7 et 46°C et sa production d'entérotoxines serait possible entre 10 et 45°C (Mossel et al., 1990). La température optimale de croissance de *Staphylococcus* est de 37°C (Kloos et Schleifer, 1986). La croissance de *S. aureus* et sa production d'entérotoxines sont complètement inhibées à une température inférieure à 7°C (Mossel et al., 1990). *Staphylococcus* survit à une température proche de 20°C dans un milieu à pH neutre (Whiting et al., 1996).

II.5.1.2. Effet de la concentration en sel (NaCl)

S. aureus est une bactérie halotolérante capable de se multiplier en milieu de laboratoire jusqu'à 12% de NaCl (Han et al., 2005). Il peut survivre avec 20% de NaCl en bouillon de culture (Sutherland et al., 1994). Les entérotoxines staphylococciques ne sont pas produites à des concentrations de NaCl supérieures à 18%. La croissance de *S. aureus* et la production d'entérotoxines sont totalement inhibées à 24% de NaCl (Han et al., 2005). Des fortes concentrations en sel modifient la composition en acides gras de la membrane, produisant un changement dans la perméabilité de la membrane (Martin et al., 1999).

II.5.1.3. Effet de l'activité de l'eau (a_w)

L'activité de l'eau conditionne ainsi la croissance de *S. aureus* et son osmotolérance. En condition aérobie, l' a_w minimum pour la croissance de *S. aureus* se situe à 0,83, tandis qu'en anaérobiose elle se situe à 0,90 (Mossel et al., 1990). Une diminution de l' a_w entraîne une diminution de la quantité d'entérotoxines produites (Sesques, 1994). *S. aureus* réagit à l'abaissement de l' a_w en accumulant dans la cellule des concentrations élevées de solutés telles que la proline, la taurine ou la glycine betaine (Vilhelmsson et Miller, 2002; Stewart et al., 2005). L'accumulation de ces solutés dépendant du type d'humectant (NaCl, saccharose ou glycérol) utilisé pour faire varier l' a_w .

II.5.1.4. Exigences nutritionnelles

Les exigences nutritionnelles de souches de *S. aureus* sont dépendantes de la composition du milieu. *S. aureus* exige pour sa croissance une source azotée qui peut être des acides aminés et des vitamines du groupe B ou du sulfate d'ammonium (NH₄)₂SO₄ (Kloos et Scheifer 1986). L'addition de glutamate, de proline, et de thréonine à concentration de 30 mg/l favorise la croissance de *S. aureus* et sa production d'entérotoxines (Keller et al. 1978). Sept souches de *S. aureus* en milieu chimiquement défini exigent pour leur croissance de l'arginine, de la proline, de la cystine, de la valine, de la leucine et de la glycine (Lincoln et al., 1995). Onoue et Mori, (1997) confirment l'auxotrophie pour la valine, l'arginine et la cystine en milieu chimiquement défini mais observent que celle pour la proline dépend des souches. Dans cette étude, il était également noté que la production d'entérotoxines dépendait de la composition du milieu en acides aminés et de la souche. Ces effets sont différents d'une entérotoxine à l'autre. La production d'entérotoxine SEA diminue fortement en absence de certains acides aminés; par exemple, elle diminue de 50% dans des milieux chimiquement définis sans thréonine. Par contre, la production des entérotoxines SEB et SEC n'est modifiée que très faiblement. *S. aureus* peut également utiliser le glucose, le lactose, le maltose comme source d'énergie.

II.5.1.5. Effet du potentiel d'oxydoréduction

Le potentiel d'oxydoréduction peut intervenir au niveau de l'expression des gènes, du métabolisme, de la physiologie (Riondet et al., 2000, Ouvry et al., 2002).

L'effet du potentiel redox sur la croissance de *S. aureus* en lait ou en milieu de laboratoire est rarement étudié en raison de la difficulté à effectuer cette mesure (Lamprell, 2003). Plusieurs études ont montré que des changements de potentiel redox modulaient la croissance cellulaire ou la production des composés extracellulaires (Bespalov et al., 1996; Aubert et al., 2002).

La production d'entérotoxines serait plus importante dans un lait oxydé que dans un lait réduit (Lamprell, 2003).

II.5.1.6. Effet des hautes pressions

Le traitement par les hautes pressions consiste à appliquer un pressage isostatique à froid (pression identique dans toutes les directions de l'espace, en tout point de l'enceinte et donc du produit). Il provoque la destruction des microorganismes en agissant sur les membranes et les parois cellulaires.

S. aureus est une bactérie sensible aux hautes pressions (Vannini et al., 2004). L'application d'une haute pression réduit la population de *S. aureus* dans le lait ou dans le fromage mais cette technique est plus efficace en combinaison avec d'autres facteurs. En lait UHT, une pression de 500 MPa combinée avec une température de 50°C pendant 15 min réduit la population de *S. aureus* de 6 log₁₀ tandis que l'application uniquement d'une haute pression ne la réduit que d'un log₁₀ (Patterson et Kilpatrick, 1998). Les activités antimicrobiennes du système lactoperoxydase et du lysozyme sont augmentées sous les hautes pressions en raison d'une modification de structure de ces enzymes (Vannini et al., 2004). Cependant, l'application d'une hautes pressions peut altérer les propriétés organoleptiques des fromages au lait cru car elle réduit la flore totale du lait cru, dénature plus ou moins réversiblement les protéines, modifiant ainsi les activités de nombreuses enzymes (Drake et al., 1997).

II.5.2. Effet de facteurs biotiques

L'adjectif biotique qualifie ce qui est propre à la vie. Les facteurs biotiques sont un ensemble de facteurs écologiques liés aux êtres vivants. Le pH et divers métabolites, résultant des activités microbiennes sont capables d'inhiber la croissance de *S. aureus*. Dans les fromages, *S. aureus* cohabite avec différentes espèces de bactéries lactiques, non lactiques, de levures et de moisissures, évoquées dans le paragraphe I.1.

II.5.2.1. Effet du pH

Les *Staphylococcus* peuvent croître à des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3 avec un optimum de croissance pour des valeurs de pH entre 7,0 et 7,5 (Kloos et Schleifer, 1986). La valeur minimale pour la croissance dépend des conditions d'aérobiose; elle est de pH 4,0 en aérobiose et 4,6 en anaérobiose dans un milieu de laboratoire (Mossel et al., 1990). L'effet du pH sur la croissance de *S. aureus* est lié à plusieurs facteurs environnementaux et aussi au type d'acide utilisé pour ajuster le pH du milieu (Sutherland et al., 1994). La production d'entérotoxines est inhibée à des

valeurs de pH inférieures à 5,3 (Mossel et al., 1990), elle est maximale aux valeurs de pH comprises entre 6,5 et 7,0 dans des milieux de laboratoire (Markus et Silverman, 1970; Su et Wong, 1998).

II.5.2.2. Métabolites microbiens inhibiteurs

Les bactériocines, les acides gras libres, le pH et le peroxyde d'hydrogène sont les principales substances capables d'inhiber la croissance de *S. aureus*.

- Les bactériocines

Les bactériocines sont des molécules de nature protéique à effet bactéricide dirigé contre les espèces généralement apparentées aux bactéries productrices (Klaenhammer, 1993). Elles se répartissent en quatre classes:

La classe I : les lantibiotiques, sont de petits peptides hydrophobes de Poids Moléculaire (PM) inférieur à 5 kDa qui agissent au niveau de la membrane et contiennent des acides aminés non usuels comme les lantionines β - methylantionine et des résidus comme dihydroalanine ou dihydrobutyrine. La nisine appartient à cette classe. La nisine en tant qu'additif alimentaire (agent de biopréservation) est autorisée dans près de 50 pays (Delves-Broughton et al., 1996).

La classe II : leur structure est variable, d'où la subdivision en plusieurs sous-classes. Ce sont des petites bactériocines (PM inférieur à 10 kDa) thermostables.

La classe III : rassemble les bactériocines de taille supérieure à 30 kDa, thermolabiles (elles sont inactivées à 60°-100°C pendant 10 à 15 min).

La classe IV : regroupe des bactériocines plus complexes et exigeant des structures glucidiques, lipidiques ou la présence de deux peptides pour leur activité.

La majorité des bactériocines identifiées agissent sur les bactéries à Gram positif en formant des pores dans la membrane cytoplasmique des cellules cibles. Elles provoquent des changements dans la perméabilité membranaire, ce qui diminue la force proton-motrice (PMF) des cellules sensibles (Ennahar et al., 2000 ; Hechard et al., 2002). Le spectre d'action des bactériocines est plus ou moins large. Plusieurs bactériocines sont capables d'inhiber la croissance de *S. aureus* en milieux de laboratoire (Maisnier-Patin et al. 1996; Olasupo et al., 1999), dans le lait (Laukova et Czikkova, 1999; Morgan et al., 2000) ou en fromage (Stecchini et al., 1991; Rodriguez et al., 2000). Le tableau 10 recense les bactéries productrices de

Tableau 10: Bactéries productrices de bactériocines inhibitrices de *S. aureus*

Bactérie	Bactériocine	Milieu	Référence
<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterocine AS-48	Milieu de laboratoire	Ananou et al., 2004
<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterocine AS-48	Saucisson	Ananou et al., 2005
<i>Enterococcus</i>	EntB	Milieu de laboratoire	Eraso et Ines, 2004
<i>Enterococcus faecium</i>	EnterocineP Enterocine	Milieu de laboratoire	Cintas et al., 1997
<i>Enterococcus faecium</i>	CCM4231	Lait de soja	Laukova et Czikkova, 1999
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lacidine A	Milieu de laboratoire	Liao et al., 1994
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricine	Milieu de laboratoire	Hernandez et al., 2005
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NI	Fromage (Montasio)	Stecchini et al., 1991
<i>Lactococcus lactis</i>	Lacticine 3147	Lait	Morgan et al., 2000
<i>Lactococcus lactis</i>	Pediocine	Fromage	Medina et al., 2005
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisine	Fromage à pâte pressé	Rodriguez et al., 2000
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisine	Cheddar	Zottola et al., 1994
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisine	Jebn	Hamama et al., 2002
<i>Lactococcus garvieae</i>	Garviecine L1-5	Milieu de laboratoire	Villani et al., 2001
<i>Lactococcus garvieae</i>	NI	Milieu de laboratoire	Ammor et al., 2006

NI : nom de la bactériocine non indiqué

bactériocines inhibitrices de *S. aureus*. L'activité des bactériocines dépend des conditions de culture (pH, température d'incubation, concentration en NaCl, autres facteurs). L'effet antagoniste de la nisine vis-à-vis de *S. aureus* diminue quand la température d'incubation augmente. La nisine agit en synergie avec le NaCl (7% w/v) pour inhiber la croissance de *S. aureus* (Thomas et Wimpenny, 1996). L'application d'une hautes pressions de 400 MPa augmente significativement l'activité antistaphylococcique de la lacticine 3147 (Morgan et al., 2000).

En début de processus alimentaire, il peut être rajouté soit des souches microbiennes productrices de bactériocines, soit des bactériocines.

L'ajout d'*Enterococcus faecalis* productrice d'enterocine AS-48 ou l'ajout direct de cette bactériocine AS-48 à concentration de 40 µg/g dans du saucisson diminue de 5,31 log₁₀ ufc/g le niveau de *S. aureus* (Ananou et al., 2005). L'addition de 3200 AU/ml d'enterocine d'*Enterococcus faecium* diminue de 3,55 log₁₀ la population de *S. aureus* par rapport au contrôle sans bactériocine dans le lait de soja (Laukova et Czikkova, 1999).

- Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Toxicité du peroxyde

L'H₂O₂ peut oxyder les résidus méthionine et cystéine des protéines entraînant leur inactivation (Imlay, 2003). Il peut aussi être réduit en (OH) par le Fe⁺⁺ et le Cu⁺⁺. Suit à cette réaction de Fenton, le radical hydroxyle (OH) très réactive, peut modifier la structure de l'ADN. C'est pourquoi la toxicité peut être réduite par la présence de chélateurs du fer (Cosgrove et al. 2007). Le peroxyde d'hydrogène peut aussi affecter la perméabilité membranaire et l'osmorégulation en modifiant les compositions lipidiques et protéiques des membranes.

En lait, le peroxyde d'hydrogène peut aussi avoir un effet sur la croissance des bactéries par l'activation du Système Lactoperoxydase-Thiocyanate-Peroxyde d'hydrogène (LPS). En présence de peroxyde d'hydrogène, la lactoperoxydase catalyse l'oxydation du thiocyanate principalement en produits qui ne seraient pas inhibiteurs, mais au cours de cette réaction principale des intermédiaires plus ou moins toxiques peuvent être produits comme l'ion hypothiocyanate (OSCN-) ou des oxyacides (O₂SCN-, O₃SCN-). D'autre part, ce système LPS entraîne des lésions dans la membrane des bactéries, causant des fuites d'ions potassium, d'acides aminés

Tableau 11: Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par différentes espèces bactériennes et inhibition de *S. aureus*

Souche	Température d'incubation	Agitation	Concentration d'H ₂ O ₂ µg/ml	Inhibition de <i>S. aureus</i>	Concentration inhibitrice µg/ml	Référence
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	45	Sans	1	ND	ND	Gilliland et Speck, 1969
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	5	Sans	0,42	ND	ND	Villegas et Gilliland, 1998
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	5	Avec	0,43	ND	ND	Villegas et Gilliland, 1998
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	5	Sans	115	ND	ND	Yap et Gilliland, 2000
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> T31	37	Avec	174	ND	ND	Batdorj et al., 2007
<i>Lactobacillus gasseri</i>	37	Avec	178	Oui	56	Otero et al., 2006
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasi</i> F2	37	Sans	0	ND	ND	Ocana et al., 1999
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasi</i> F2	37	Avec	92	oui	30	Ocana et al., 1999
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasi</i> F28	37	Sans	0	ND	ND	Ocana et al., 1999
<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasi</i> F28	37	Avec	62	oui	30	Ocana et al., 1999
<i>Lactobacillus plantarum</i> AI 78	37	Avec	74	Oui	77	Ito et al., 2003
<i>Lactococcus lactis</i> ACI	32	Sans	1	ND	ND	Gilliland et Speck, 1969
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> AI62	37	Avec	95	Oui	77	Ito et al., 2003
<i>Streptococcus pyogenes</i>	37	Avec	204	ND	ND	Seki et al., 2004

ND= non déterminé

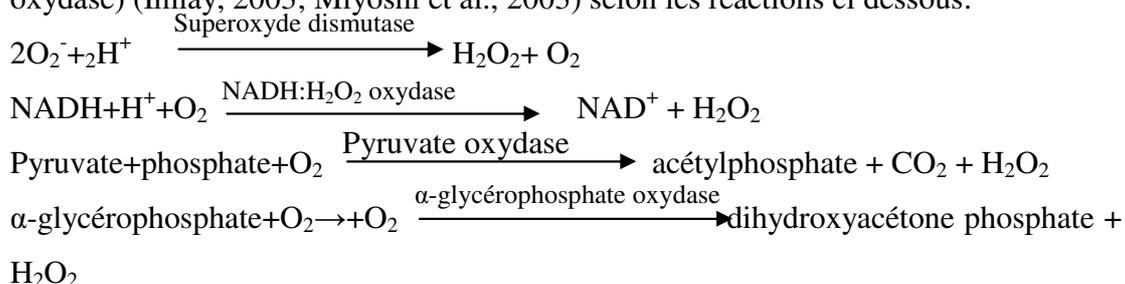
et de polypeptides cellulaires. Les systèmes de transport des sucres, des acides, les synthèses d'ARN, d'ADN ou de protéines sont inhibées.

Le système LPS a une activité antimicrobienne plus importante contre les bactéries à Gram négatif que contre les bactéries à Gram positif, cependant il peut inhiber *S. aureus* (Buys et al., 2004). Kamau et al (1990) ont démontré que le LPS augmente la sensibilité de *S. aureus* au traitement thermique. L'inhibition de *S. aureus* par le système LPS est plus importante en bouillon de culture que dans le lait (McLay et al., 2002), mais son effet bactériostatique ou bactéricide a été mis en évidence dans des laits de chèvre (Buys et al., 2004).

Le peroxyde d'hydrogène à une concentration comprise entre 1,65 et 3,3 mM/l a un effet bactériostatique sur *S. aureus*. Alors que, à une concentration supérieure à 3,3 mM/l a un effet bactéricide en milieu de laboratoire (Otero et al., 2006). 0,2 mM/l d'H₂O₂ peuvent inhiber la croissance de *Lactococcus lactis*, néanmoins la préadaptation de *Lactococcus lactis* à des concentrations sublethales d'H₂O₂ lui permettrait de résister à 1,5 mM/l d'H₂O₂ (Miyoshi et al., 2003).

Production bactérienne d'H₂O₂

L'H₂O₂ peut être produit par de nombreuses espèces de bactéries lactiques; *Lactococcus* (Haines et Harmon, 1973; Ito et al., 2003), *Streptococcus* (Seki et al., 2004) et *Lactobacillus* (Ocana et al., 1999; Ito et al., 2003; Otero et al., 2006; Batdorj et al., 2007) (cf. Tableau 11). Sa production est généralement plus importante en culture agitée. Elle atteint sa concentration maximale pendant la phase exponentielle de la croissance (Ocana et al., 1999; Otero et al., 2006). L'H₂O₂ peuvent être formé par autooxydation des enzymes de la chaîne respiratoire, par autooxydation des flavoenzymes, par l'activité de superoxyde dismutases (Sod), et par des diverses oxydases (NADH oxydase, pyruvate oxydase, lactate oxydase, glycérophosphate oxydase) (Imlay, 2003; Miyoshi et al., 2003) selon les réactions ci dessous:



L'enzyme superoxyde dismutases a été décrite dans plusieurs espèces de bactéries lactiques comme *Lactococcus* (Sanders et al., 1995) et *Lactobacillus* (Lin et Yen, 1999), elle est aussi présente chez *Staphylococcus* (Poyart et al., 1995). *S. aureus* synthèse des superoxydases dépendant du manganèse avec une activité et synthèse maximal après la phase exponentielle et dans des cultures fortement agitées (Clements et al., 1999).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis* (Villegas et Gilliland, 1998) et *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Marty-Teyssset et al., 2000) possèdent une NADH:H₂O₂ oxydase. Une pyruvate oxydase a été purifiée chez *Lactobacillus plantarum* (Sedewitz et al., 1984) et une lactate oxydase chez *Streptococcus pyogenes* (Seki et al., 2004). L'enzyme α - glycérophosphate oxydase est présenté chez *Enterococcus*, *Lactobacillus* ainsi que *Pediococcus pentosaceus* (Condon, 1987) utilisant le glycérol en tant que substrat dépendant de l'oxygène pour leur croissance.

Activités antioxydantes de *S. aureus* et des bactéries lactiques

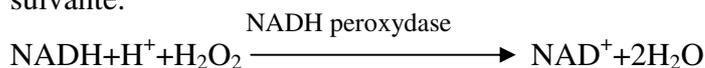
L'équipement enzymatique de *S. aureus* lui permet de résister au stress oxydant. En effet, cette espèce est équipée de catalase (KatA), d'Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC), de thiol-dépendante peroxydase (Bcp) et de thioredoxine réductase (TrxB) (Horsburgh et al., 2001). Les propriétés antioxydantes de *S. aureus* sont liées à l'homéostasie du fer et de manganèse via plusieurs régulateurs. Ces enzymes sont régulées par un régulateur de "capture" de fer (Fur), un régulateur de réponse aux peroxydes (PerR), régulateur de capture du Zn (Zur) et un régulateur de transcription dépendant du Manganèse (Mntr) (Horsburgh et al., 2001; Cosgrove et al., 2007).

L'activité catalasique de *S. aureus* augmente avec la température de 25 à 37°C. Elle augmente durant la phase de croissance de la bactérie pour être maximale durant la phase stationnaire de croissance (Martin et Chaven, 1987).

La staphyloxanthine, un pigment caroténoïde localisé dans la membrane cellulaire de *S. aureus*, serait un antioxydant qui protégerait les lipides, les protéines et l'ADN de l'effet délétère d'H₂O₂ (Clauditz et al., 2006).

L'accumulation de manganèse par des espèces de bactérie lactique tel que *L. plantarum* aurait une capacité antioxydante par destruction de l'H₂O₂ (Archibald et Fridovich, 1981). Des peroxydases tel que la NADH peroxydase décrites chez *L.*

lactis (Miyoshi et al., 2003) sont capables de dégrader l'H₂O₂ selon la réaction suivante:



Des pseudocatalases sans groupement hémique et dépendant du manganèse ont été détectées chez *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei* et *L. lactis*. Seule l'enzyme de *Lb. casei* est active en raison de plus forte concentration intracellulaire de manganèse (Rochat et al., 2006).

- *Acides gras et monoglycérides*

Les acides gras sont formés à partir des triglycérides par l'action des lipases, du métabolisme des hydrates de carbone ou de la dégradation des acides aminés. Les effets bactéricides des acides gras résultent de l'incorporation de ces agents lipophiles dans les membranes bactériennes causant une fluidité accrue de ces membranes et une diminution de leurs fonctions essentielles (Kanai et Kondo, 1979; Voegas et Correia, 1991).

L'effet des acides gras sur la croissance de *S. aureus* est lié à la température d'incubation, à la concentration de l'acide gras et à son degré de saturation. Il est modulé par des processus de peroxydation impliquant l'H₂O₂ et le fer. Ainsi, l'acide arachidonique est faiblement inhibiteur de *S. aureus*, alors que l'acide laurique (C12:0) est le plus inhibiteur des acides testés par Knapp et Melly, (1986). Kabara et al, (1980) ont montré que 99,5% des souches *S. aureus* d'origine humaine sont sensibles à des concentrations de 0,39 mmol/l d'acide laurique et de 10 mmol/l d'acide caprique. L'acide linoléique a aussi un effet inhibiteur plus marqué sur des souches de *S. aureus* d'origine animale que sur celles d'origine humaine (Kabara et al., 1980).

Ce pendant, l'effet des acides gras sur *S. aureus* serait réduit car cette espèce est capable de les estérifier par l'enzyme FAME (Fatty Acid Modifying Enzyme) (Mortensen et al., 1992).

- *Diacétyle*

Le diacétyle est produit par des bactéries lactiques comme *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* par métabolisme des sucres via le pyruvate (Molimard et Spinnler, 1996). A des concentrations comprises entre 0,5 et 8 mmol/l, il inhibe *S. aureus* lorsque le pH du milieu se situe entre 5,0 et 7,0 (Jay, 1982; Bowles et al., 1995).

- Populations microbiennes impliquées dans la synthèse des molécules inhibitrices

Les métabolites microbiens inhibiteurs sont essentiellement produits par les espèces de bactéries lactiques; ainsi:

- les L-lactate et D-lactate peuvent être produits par les *Lactococcus*, les *Lactobacillus*,
- le peroxyde d'hydrogène est synthétisé par *Lactococcus* (Haines et Harmon, 1973; Ito et al., 2003), *Streptococcus* (Seki et al., 2004) et *Lactobacillus* (Ocana et al., 1999; Otero et al., 2006; Batdorj et al., 2007),
- les bactériocines ont été décrites chez de nombreuses espèces de bactéries lactiques (cf. Tableau 10).

La croissance de *S. aureus* ou la production d'entérotoxines en bouillon BHI n'est pas inhibée en présence de *Micrococcus varians* ou des souches de *Staphylococcus* à coagulase négative (Gonzalez-Fandos et al., 1996).

II.6. Comportement de *S. aureus* dans des produits laitiers

II.6.1. Sources de contamination des laits et des fromages

En appliquant la technique de PFGE, Vautor et al. (2003) ont montré que la source principale de contamination des laits de brebis était les mammites sub-cliniques. De la même manière, Jorgensen et al, (2005) ont distingué des souches de *S. aureus* isolées de différents environnements par PFGE et polymorphisme de gènes codant pour les entérotoxines. Ils ont conclu à une même source de contamination pour les produits. L'analyse des séquences multilocus des souches de *S. aureus* a permis de montrer qu'un seul groupe clonal était responsable d'infection dans un troupeau (Smith et al., 2005). Le polymorphisme des gènes *ClfA*, *ClfB*, *ssp* et *sdr* a permis de montrer que l'infection par *S. aureus* dans un élevage de chèvre du nord de l'Italie était due à un seul clone bactérien (Moroni et al., 2005).

Callon et al. (2007) ont pu montrer que dans les exploitations caprines, les contaminations des laits pouvaient avoir des origines multiples mais elles provenaient essentiellement du tank à lait et occasionnellement de la machine de traite ou de l'homme.

Tableau 12: Niveau maximal de *S. aureus* dans les fromages et production des entérotoxines

Fromage	Niveau maximal de <i>S. aureus</i> log ₁₀	Temps	Production d'entérotoxines	BL	pH	ES%	T°C	[Nacl]	Diminution pendant l'affinage log ₁₀	Référence
Camembert	7,0	22 h	oui (SEA)	8,0	6,3	51,5	22	0,12%	- 1,0	Meyrand et Vernozy-Rozand, 1999
Cantal	4,0	24 h	ND	9,0	5	58,8	ND	3,7	- 0,5	Lamprell 2003
Manchego	6,06	48 h	oui (SEA et SED)	6,95	5	ND	25	Saumure	Oui	Gomez-lucia et al., 1992
Manchego	7,0	48 h	non	ND	5	ND	25	Saumure	Oui	Otero et al., 1993
Saint - Nectaire	6,24	24 h	oui	9,0	5,25	50,85	ND	ND	- 0,5	Sesques 1994
Serra d'Estrela lait pasteurisé	7,18	4 j	ND	9,03	5,4	50,33	9	1,2	- 0,62	Macedo et al., 2004
Serra d'Estrela lait cru	7,94	4 j	ND	8,7	5,93	50,38	9	1,36	- 2,2	Macedo et al., 2004
Sufu	9,0	ND	oui	6,0	ND	ND	37	Saumure à 12%	ND	Han et al., 2005
Sufu	pas de croissance	ND	non	6,0	ND	ND	37	Saumure à 24%	ND	Han et al., 2005
Tome de Savoie	4,0	24 h	ND	ND	5,1	49,1	ND	ND	- 0,54	Lamprell 2003

ND= non déterminé ; BL= Bactérie Lactique

II.6.2. Comportement de Staphylococcus aureus dans les fromages et production d'entérotoxines

II.6.2.1. Croissance de S. aureus

Dans la plupart des fromages quel que soit le type de technologie de fabrication, les conditions de fabrication et d'affinage, *S. aureus* atteint son niveau maximal durant les trois premiers jours mais le plus souvent pendant les premières 24 h de fabrication. Par exemple, le niveau de *S. aureus* a atteint son maximum après 3 jours dans des fromages au lait cru de chèvre préparés sans ferment, dont le pH était de 5,8, l'extrait sec de 52% et la teneur en NaCl de 1,46% (w/v) (Mas et al., 2002). *S. aureus* ne se développe pas dans les fromages à pâte pressée cuite en raison du chauffage du caillé et des valeurs de pH <5,3 le lendemain de la fabrication (Bachmann et Spahr, 1995).

En cours d'affinage, selon le type de fromages et les conditions environnementales (température, humidité), la population se stabilise ou tend à diminuer en particulier lors d'affinage long. Dans le fromage Serra d'Estrela, la population de *S. aureus* diminue de 2 log₁₀ ufc/g pendant la durée d'affinage (Macedo et al., 2004). Ainsi, le niveau de *S. aureus* reste stable dans les fromages de chèvre de technologie présure alors qu'il tend à diminuer dans ceux à coagulation lactique (Vernozy-Rozand et al., 1998).

Le niveau de population maximale est variable en fonction du niveau initial de *S. aureus* dans le lait et des technologies fromagères en relation avec l'ensemencement ou non de bactéries lactiques, le pH, l'a_w, les concentrations de NaCl, la taille du fromage et la température du caillé (Meyrand et Vernozy-Rozand, 1999). Le tableau 12 rassemble ainsi les données de la littérature sur l'évolution de *S. aureus* dans différents types de fromages en fonction de ces facteurs. Par exemple, une saumure à 24% de NaCl inhibe totalement la croissance de *S. aureus* dans le fromage Sufu.

Le niveau de *S. aureus* dans les fromages pourrait être contrôlé par des souches productrices de bactériocines; l'inoculation de *Lactobacillus plantarum* produisant une bactériocine dans le lait de fabrication de fromage Montasio diminue significativement la population de *S. aureus* après 10 jours d'affinage (Stecchini et al., 1991).

L'ensemencement dans du lait de souches de *Lactococcus lactis* productrices de nisine diminue la population de *S. aureus* après 24 h de fabrication en fromage de type pâte

pressée (Rodriguez et al., 2000), en fromage frais marocain (Hamama et al., 2002) ou en Cheddar (Zottola et al., 1994).

II.6.2.2. Production d'entérotoxines

La production d'entérotoxines par *S. aureus* dans les fromages dépend de la capacité des souches de *S. aureus* à produire des entérotoxines. Seulement 7,40% des souches de *S. aureus* d'origine fromagère sont capables de produire des entérotoxines en milieu BHI. Parmi 23 isolats produisant des entérotoxines dans le BHI, seulement 17 isolats sont capables de produire des entérotoxines en fromage (Lamprell, 2003).

Les entérotoxines sont produites pendant les 6 premières heures dans un fromage expérimental à pâte pressée non cuite (Lamprell, 2003). Ainsi, Meyrand et al. (1998) ont montré que 3,2 ng d'entérotoxine A étaient produits après 34 jours de fabrication dans un fromage de type Camembert au lait de chèvre avec un accroissement du niveau de population de *S. aureus* de 2 log₁₀ de 10⁵ ufc/ml initial à 10⁷ ufc/g après 1 jour de fabrication.

D'après Vernozy-Rozand et al. (1998), une souche de *S. aureus* productrice d'entérotoxine A n'en produit en fromage que si son niveau dans le lait est supérieur à 10⁴ ufc/ml. A des concentrations initiales de *S. aureus* de 10⁵ et 10⁶ ufc/ml, 1 à 2,5 ng d'entérotoxine A sont détectés.

MATERIEL ET METHODES

1. Croissance de *Staphylococcus* coagulase positive (SC+) et production d'entérotoxines dans des fromages fermiers AOC Saint-Nectaire. *"Les résultats correspondant à cette partie seront présentés dans le chapitre 1 de la partie résultats".*

1.1. Le fromage AOC Saint-Nectaire

Le concept d'AOC est défini par la loi du 6 juillet 1966 comme suit : «constitue une appellation d'origine, la dénomination d'un pays, d'une région ou d'une localité servant à désigner un produit qui en est originaire et dont les qualités ou les caractères sont dus au milieu géographique, comprenant des facteurs naturels et des facteurs humains ». Les fromages AOC sont produits dans une zone délimitée définie dans un cahier des charges qui précise aussi les conditions de production de lait, de transformation, d'affinage. Le nouveau décret du fromage bénéficiant de l'appellation d'origine « Saint Nectaire » pris comme modèle d'étude dans le premier chapitre de cette thèse est paru au journal officiel le 31 mars 2007 «C'est un fromage exclusivement fabriqué avec du lait de vache emprésuré, à pâte pressée, non cuite, fermentée et salée, se présentant sous la forme d'un cylindre légèrement détalonné de 20 à 24 cm de diamètre et de 3,5 à 5,5 cm de hauteur et dont le poids n'excède pas 1,850 kg. Sa durée minimale d'affinage est de 28 jours après entrée en cave. Le « Saint-Nectaire » peut également être fabriqué dans un format réduit, de 12 à 14 cm de diamètre et 3,5 à 4,5 cm de hauteur et dont le poids n'excède pas 0,650 kg. Dans ce cas, la durée minimale d'affinage est réduite à 21 jours après entrée en cave. La teneur en matière grasse du fromage est de 45 grammes au minimum pour 100 grammes de fromage après complète dessiccation. Sa teneur en matière sèche ne doit pas être inférieure à 50 grammes pour 100 grammes de fromage affiné».

Le Saint Nectaire laitier est fabriqué en entreprise, avec du lait généralement pasteurisé et collecté dans plusieurs exploitations agricoles.

Le fromage AOC Saint-Nectaire fermier se place en première position en termes de tonnage annuelle (6194 tonnes/an). Il est fabriqué immédiatement après la traite en exploitation agricole avec le lait cru issu du seul troupeau de l'exploitation. Il est produit dans 287 fermes.

1.2. Choix des exploitations

Quatre exploitations de production de fromages AOC Saint-Nectaire ont été choisies dans la zone de Saint-Nectaire par les responsables de la filière Saint-Nectaire. Deux campagnes de prélèvement ont été réalisées. La première campagne a eu lieu en hiver entre le 9 mars et le 31 mars 2004, et la deuxième en été quand les vaches étaient à l'herbe entre le 12 mai et le 2 juin 2004.

1.3. Fabrication des fromages AOC Saint-Nectaire

Tous les fromages ont été fabriqués avec du lait cru de la traite du matin. A la fin de la traite, le lait a été chauffé dans des cuves en inox à 32-33°C. Puis la présure a été ajoutée à un taux de 27.5 à 30 ml/100 litres de lait selon la ferme. Le décaillage, effectué 45 min après l'addition de la présure, était suivi d'un brassage de 10 min. Le caillé obtenu après soutirage du lactosérum a été pré-pressé. Il a ensuite été moulé et pressé pendant 24 h à environ 2 bars. La température de la pièce de pressage était d'environ 24°C. La surface des fromages a été salée avec 30 g/kg de gros sel au début du pressage. Après 1 jour, les fromages ont été démoulés et affinés en cave pendant 28 jours.

1.4. Prélèvements

Le lait cru a été directement prélevé dans la cuve à la fin de la traite et les fromages ont été prélevés 6 h après emprésurage (C6), puis 1 jour (24 h), 8 jours (8J) et 28 jours (28J) après fabrication. Quatre carottes ont été prélevées dans chaque fromage avec une sonde stérile. La croûte de chaque échantillon de fromage a été éliminée. Les échantillons destinés au dénombrement de *Staphylococcus* à coagulase positive (SC+) et d'autres flores bactériennes ont été conservés une nuit à 4°C jusqu'à l'analyse. Les échantillons pour la recherche d'entérotoxines ont été congelés à -20°C.

1.5. Paramètres physico-chimiques

Les pH des laits et des fromages de toutes les fabrications ont été mesurés avec un pH-mètre 926 VTV muni d'une électrode Ingold 406 MX (Mettler-Toledo S.A., Viroflay-France). Les teneurs en extraits secs ont été déterminées selon la méthode de référence NF V04-6282 (12/95).

Tableau 13: Conditions de dénombrement : milieux, temps et températures d'incubation

Milieu	incubation		cible présumée	Références
	Temps (jours)	Température (°C)		
Milieu 17 (M17)	3	30	Microorganismes mésophiles	Terzaghi et Sandine. 1975
M17	2	42	Microorganismes thermophiles	Terzaghi et Sandine. 1975
Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF)	1	37	<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase + et bactéries d'affinage	De Buyser et al., 2003
Slanetz Bartley (SB)	2	42	Entérocoques	Slanetz et al., 1957
Oxytetracycline Glucose Agar (OGA)	3 à 4	25	Levures et moisissures	FIL-IDF 94B, 1991
Facultatively Heterofermentative (FH)	3	30	Lactobacilles mésophiles hétérofermentaires facultatifs	Isolini et al., 1990
Turner + acide nalidixique (T+a.n.)	3	30	Lactocoques	Turner et al., 1963
PCA+Lait+inhibiteur de bactéries à Gram+ (PCA+L+I)	3	30	Bactéries à Gram négatif	FIL-IDF 100B, 1991
Mayeux Sandine Elikor (MSE)	3	30	<i>Leuconostoc</i>	Mayeux et al., 1962
Cheese Ripening Bacteria Medium (CRBM)	5 et 10	25	Bactéries d'affinage	Denis et al., 2001
Violet red Bile Glucose (VRBG) agar	1	42	Entérobactéries	NFV 08-021, 1985

Bactéries à Gram - : bactéries à Gram négatif

Le milieu FH a été incubé en conditions d'anaérobiose

1.6. Analyses microbiologiques et milieux de culture

Les échantillons de lait ont été homogénéisés et agités manuellement pendant 30 secondes. Les échantillons de fromage C6, J+1 et J+30 ont été dilués au 1/10 dans du phosphate di-potassique à 2 % (p/v) et broyés à l'aide d'un broyeur à palettes – Stomacher- (MIX 1, AES Laboratoire, Combourg - France) pendant 4 min. Le broyat obtenu correspond à la suspension mère au 1/10. Cette suspension a été successivement diluée en dixième dans 9 ml de solution de peptone sel. Les milieux de culture gélosés ont étéensemencés avec un ensemenceur spiral, sauf les milieux VRBG et le milieu d'Isolini et al., 1990 (FH) qui ont étéensemencés en profondeur. Les SC+ ont été dénombrés selon la norme ISO 6888-2 (De Buyser et al., 2003) sur le milieu RPFA incubé pendant 24 h à 37°C. Les principaux milieux de culture utilisés et les conditions d'incubation sont indiqués dans le tableau 13. Leur composition est donnée dans l'annexe 1. Les résultats des dénombrements sont exprimés en log₁₀ UFC/mL de lait ou en log₁₀ UFC/g de fromage.

1.7. Détection des entérotoxines staphylococciques dans le fromage

Les entérotoxines (A-E) ont été recherchées dans les échantillons de fromage (25 g) à l'aide du kit Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins (ST 0796, Diffchamb, Lyon, France) selon les conditions indiquées par le fournisseur. Ils ont été analysés par le Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières (LIAL)-Massif Central (Aurillac, France). Le seuil de détection de ce kit est de 0,1 ng/g déterminé par le LIAL.

1.8. Analyse statistique

Les données sur les différentes variables mesurées aux différents temps de fabrication ont été statistiquement analysées par Analyse de Variance ANOVA (ANalysis Of Variance). Lorsque les moyennes étaient significativement différentes, un test de Newman-Keuls a été réalisé. Les données microbiologiques au temps 24 h ont été intégrées dans une Analyse en Composante Principale (ACP). Les corrélations entre les variables ont été évaluées par calcul de coefficient de Pearson par le logiciel Statistica (StatSoft 2003, version 6.1, Tulsa, USA).

2. Effet de la présure et du broyage sur le dénombrement de *Staphylococcus coagulase positive* dans les laits. *"Les résultats correspondant à cette partie seront présentés dans le chapitre 1 de la partie résultats".*

2.1. Sélection de la souche de *S. aureus*

La souche SA15 de *S. aureus* isolée d'un fromage au lait cru par le LIAL (Aurillac, France) a été sélectionnée sur la base de son origine de fromage au lait cru et de sa capacité à produire des entérotoxines en milieu lait ou milieu BHI. De plus, parmi une collection de souches testées dans un programme précédent, elle était la moins inhibée par différentes souches de bactérie lactique (Rapport R97/22 DGAL, Pradel et al., 1999).

2.2. Préparation de l'inoculum de *S. aureus* SA15

Un ml de culture décongelée de *S. aureus* SA15 a été inoculé dans 9 ml de bouillon BHI. Après incubation à 37°C pendant 18 h, 4 ml de culture ont été prélevés et centrifugés (SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France) à 9600 x g pendant 15 min à 4 °C. Le culot a été lavé une fois par ajout de 4 ml de solution de Ringer (Biokar Diagnostics, Pantin, France) et centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot a été ensuite remis en suspension dans 4 ml de la solution de Ringer. Des dilutions successives ont été réalisées dans 9 ml de solution de Ringer afin d'obtenir une population initiale en *S. aureus* de 150 ufc/ml.

2.3. Collecte du lait

2.3.1. Collecte et traitement du lait de l'ENILV

Le lait a été collecté à la ferme de l'Ecole Nationale des Industries du Lait et de la Viande (ENILV) d'Aurillac juste après la traite et avant ensemencement en ferment et transporté en moins de 10 minutes au Laboratoire de Recherches Fromagères.

Le lait a été pasteurisé (pasteurisateur Perialisi série PC15-2, Jesy-France) pendant 30 sec à 72°C.

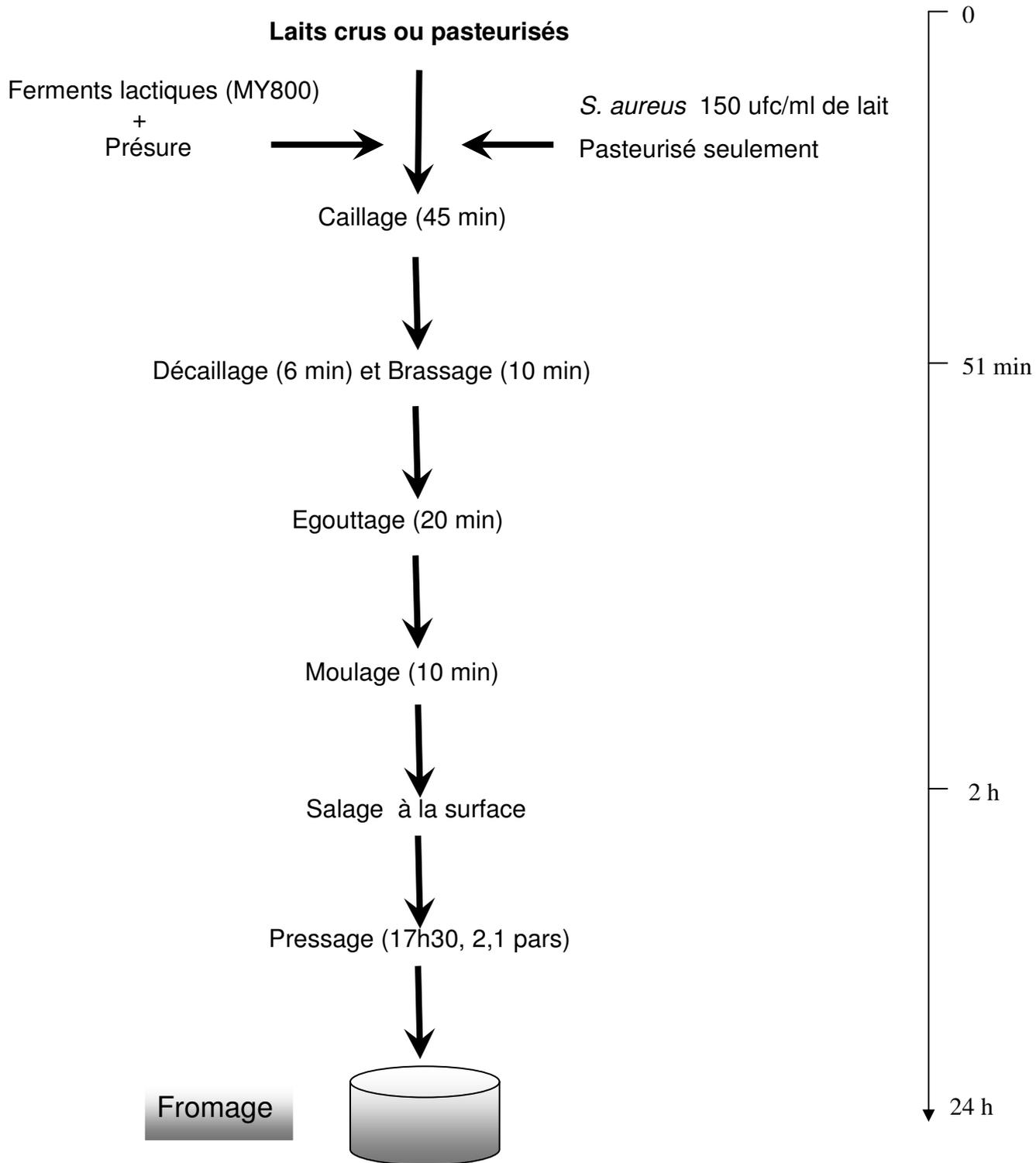


Figure 2: Protocole de fabrication de mini-fromage type Saint Nectaire (cf 3.2.6)

2.3.2. Collecte du lait de Salers

Du lait cru a été prélevé chez 11 producteurs fabriquant du fromage d'AOC Salers dans la zone autour d'Aurillac.

2.4. Protocole d'ensemencement de lait

2.4.1. Ensemencement du lait pasteurisé de l'ENILV

Le lait pasteurisé de l'ENILV a étéensemencé avec le ferment MY800 (TEXEL Dangé-Saint-Romain, France) à une concentration de 5% et avec la souche SA15 de *S. aureus* à une concentration de 150 ufc/ml de lait. Après l'inoculation, 1000 ml ont été distribués dans 10 flacons: 1) cinq flacons sans aucune présure. 2) cinq flacons avec ajout de présure (Beaugel 520-Ets Coquard, Villefranche sur Saône-France) à la concentration de 0,4 ml/l de lait.

2.4.2. Ensemencement du lait de Salers

Le lait cru de Salers a étéensemencé comme décrit pour le lait pasteurisé de l'ENILV (cf 3.2.4.1) mais en raison de la contamination naturelle en *Staphylococcus* coagulase positive, la souche *S. aureus* SA15 n'a pas été inoculée.

2.5. Condition d'incubation

Les laits préparés comme décrit dans le paragraphe 2.4 ont été incubés au Bain-Marie thermostaté selon un diagramme de température simulant celui de la fabrication du fromage Saint-Nectaire. La température a été enregistrée avec le logiciel CINAC (YSEBAERT, Frepillon- France). La température initiale était de 33°C, puis elle diminuait comme suit: 30,5°C à 3 h; 27°C à 6 h; 24°C à 9 h; 23°C à 12 h, 21°C à 18 h et 19°C après 24 h d'incubation.

2.6. Fabrication expérimentale des fromages de type Saint-Nectaire

Des fromages petits modèles d'environ 400 g ont été fabriqués avec du lait pasteurisé de l'ENILV et du lait cru de Salers selon une technologie de type Saint-Nectaire (cf. 1.3) (cf. Figure 2).

Tableau 14 : liste des souches bactériennes

Genre	Souche	Fournisseur	Lieu d'isolement
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA15	LIAL	Fromage au lait cru
	ps 219	URF	Lait de chèvre
	ps 87	URF	Fromage de chèvre
	ps 196	URF	Fromage de chèvre
	ps 325	URF	Fosses nasales humaines
	ps 332	URF	Mains d'éleveur
<i>Lactococcus garvieae</i>	N201	URF	Fromage de Saint-Nectaire
	1204	URF	Fromage de Salers
	Tan1	URF	Fromage de Saint-Nectaire
	Tan2	URF	Fromage de Saint-Nectaire
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	N650	URF	Fromage de Saint-Nectaire
	N658	URF	Fromage de Saint-Nectaire
	N688	URF	Fromage de Saint-Nectaire
<i>Enterococcus faecalis</i>	N516	URF	Fromage de Saint-Nectaire

LIAL: Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières - Massif Central (Aurillac, France)

URF: Unité de Recherches Fromagères (Aurillac, France)

2.7. Dénombrement des *Staphylococcus* à coagulase positive

Les *Staphylococcus* à coagulase positive ont été dénombrés dans les laitsensemencés ou les fromages après 0, 3, 6 et 24 h d'incubation ou de fabrication comme décrit dans le paragraphe 1.6. Les laits ont été analysés avant et après broyage de 4 min au Stomacher.

2.8. Mesure du pH

Les pH des laits ont été enregistrés en continu grâce au logiciel CINAC (YSEBAERT, Frepillon- France), les pH des fromages de toutes les fabrications décrites ont été mesurés avec un pH-mètre 926 VTV muni d'une électrode Ingold 406 MX (Mettler-Toledo S.A., Viroflay-France).

2.9. Analyse statistique

Les données sur l'effet du broyage et l'effet de la présure à 0, 3, 6 et 24 h d'incubation ont été statistiquement analysées par Analyse de Variance ANOVA (ANalysis Of Variance). Lorsque les moyennes étaient significativement différentes, un test de Newman-Keuls a été réalisé par le logiciel Statistica (StatSoft 2003, version 6.1, Tulsa, USA).

3. Effet des souches de *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* et *Enterococcus faecalis* sur le comportement de *Staphylococcus aureus*.

"Les résultats correspondant à cette partie seront présentés dans le chapitre 2 de la partie résultats".

La souche de *S. aureus* SA15 (cf origine dans le tableau 14) a été cultivée en présence de différentes souches de bactéries lactiques en lait microfiltré ou en milieu Trypticase-Soja sans sucre (TS) tamponné à pH 6,8 (cf. composition du milieu en annexe 2). Le lait entier microfiltré (lait épuré en microorganismes) (Marguerite, Villefranche sur Saône, ARNAS, France) a été choisi sur la base de sa faible contamination microbienne et de la croissance importante de *S. aureus* SA15 dans ce lait.

3.1. Effet du pH initial du lait sur la croissance de *S. aureus* SA15

Un ml de culture décongelée de *S. aureus* a été inoculé dans 9 ml de bouillon BHI modifié avec 12 g/l de lait en poudre (Lactalis industry, Bourgbarré, France). Après 18 h d'incubation à 37°C, l'inoculum de *S. aureus* a été préparé comme décrit dans le paragraphe 3.2.2.

La souche *S. aureus* SA15 a étéensemencée à 150 ufc/ml dans du lait microfiltré préalablement ajusté à différents pH 6,50; 6,25; 6,00; 5,78 et 5,60 avec de l'acide lactique à 90% (Prolabo, Lyon, France). Les cultures ont été incubées à 33°C pendant 24 h.

3.2. Co-cultures de *S. aureus* SA15 avec *Lactococcus* et *Enterococcus* en lait microfiltré

3.2.1. Choix des souches de bactérie lactique

Quatre souches de *Lactococcus garvieae* (N201, Tan 1, Tan 2 et 1204), 3 souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (N650, N658 et N688) et une souche d'*Enterococcus faecalis* N516 ont été testées en co-culture avec *S. aureus* SA15 (cf. Origine de souches dans le tableau 14). Les souches de bactérie lactique ont été identifiées par séquençage de l'ADNr 16S selon la méthode décrite par Callon et al, (2004) et leur diversité génomique a été évaluée par REP-PCR (Jersek et al. 1999). Les souches N650, N658, N688 et N516 ont été sélectionnées pour leur capacité inhibitrice mise en évidence dans une étude antérieure (Florentin, 2000).

3.2.2. Co-culture de *S. aureus* et des souches de bactérie lactique

Un ml de culture décongelée de chaque souche (cf 3.2.1) a été inoculé dans 9 ml de bouillon M17 (Biokar). La culture a été incubée à 30°C pendant 18 h. Un ml de cette culture a été inoculé dans 9 ml de lait écrémé reconstitué (Lactalis industry, Bourgbarré, France). Après 18 h d'incubation à 30°C, la culture de bactérie lactique a été inoculée dans du lait microfiltré (5 % v/v). Le lait microfiltré avait été préalablementensemencé à 150 ufc/ml de *S. aureus* SA15 préparée comme il est décrit dans le paragraphe 3.1.

3.2.3. Effets des acides aminés sur l'inhibition de *S. aureus* SA15 par *L. garvieae* N201

Les acides aminés méthionine, thréonine, phénylalanine, isoleucine et valine (MERCK, Darmstadt, Germany) ont été préparés en eau distillée et stérilisés par filtration sur filtre de cellulose de 0,45 µm de porosité (Minisart, Sartorius AG, Germany). Ils ont été ajoutés à une concentration de 10 µmol/l dans du lait microfiltré (Marguerite, Villefranche sur Saône, ARNAS, France) inoculé par *S. aureus* et *L. garvieae* comme décrit dans le paragraphe 3.2.2.

3.3. Co-cultures de *S. aureus* SA15 avec *L. garvieae* N201, *L. lactis* N658 ou *E. faecalis* N516 en milieu tamponné

Les souches, *L. garvieae* (N201), *L. lactis* subsp. *lactis* (N658), et *E. faecalis* (N516) ont été cultivées en bouillon M17 (Biokar) pendant 18 h à 30 °C, puis les cultures ont été centrifugées à 9600 x g pendant 15 min à 4 °C. Les cellules bactériennes ont été lavées une fois dans la solution de Ringer, puis remises en suspension dans la solution de Ringer. Elles ont étéensemencées en milieu TS tamponné préalablement inoculé avec *S. aureus* SA15 à 150 ufc/ml pour obtenir une concentration initiale de 10⁸ ufc/ml. Des essais préalables avaient permis de quantifier les niveaux de population des cultures bactériennes avant l'ensemencement.

3.4. Conditions d'incubation et prélèvement

Les cultures en lait microfiltré ou en milieu TS tamponné ont été incubées en Bain-Marie thermostaté comme il est indiqué dans le paragraphe 3.2.5. Des prélèvements ont été effectués à 0, 3, 6 et 24 h pour des analyses microbiologiques et biochimiques. Le pH a été enregistré en continu grâce au logiciel CINAC (YSEBAERT, Frepillon-France).

3.5. Dénombrement des microorganismes

Tous les échantillons de lait microfiltré ou de milieu tamponné ont été broyés pendant 4 min au stomacher (MIX 1, AES Laboratoire, Combourg - France). Les bactéries lactiques ont été dénombrées sur milieu M17 (Biokar diagnostic, Pantin, France) incubé pendant 48 h à 30°C. *S. aureus* SA15 a été dénombrée selon la norme ISO

6888-2 (cf 1.6). Les résultats des dénombrements microbiens ont été exprimés en Unité Formant Colonie (UFC) par ml de lait ou de milieu. Les valeurs ont ensuite été converties en logarithme décimal.

3.6. Analyses biochimiques

Des échantillons de lait microfiltré ont été stockés au congélateur à - 20°C pour les analyses biochimiques.

3.6.1. Dosage de lactose, acide lactique et acide acétique

Les concentrations en lactose, galactose, acide acétique et acide lactique dans le lait microfiltré ont été déterminées à l'aide de kits enzymatiques (ENZYPlus, Diffchamb, Lyon, France) selon le protocole préconisé par le fournisseur.

3.6.2. Dosage des acides aminés

Ces travaux ont été effectués en collaboration avec le Laboratoire Biotechnologie - Bioprocédés, INSA, Toulouse.

Les acides aminés libres du milieu ont été analysés dans les surnageants de culture après précipitation pour éviter les interférences dans les dosages. Les protéines ont été précipitées par l'ajout de quatre volumes de méthanol pour un volume de surnageant. Après une nuit dans de la glace, le mélange a été centrifugé. Le surnageant a été utilisé pour les dosages.

Les acides aminés libres du milieu de fermentation ont été dosés par un AminoQuant HP 1090, qui est une chromatographie à haute pression avec un compartiment de dérivatisation et d'injection thermostaté, contrôlé par micro-ordinateur. Les acides aminés sont dérivés de façon automatique par l'aldéhyde *ortho*-phtalique (OPA) et le 9-fluorenylméthyl-chloroformiate (FMOC-Cl). Le premier composé réagit avec les substances comportant une fonction amine primaire en présence d'un composé thiolique (acide 3-mercaptopropionique), le second acyle ensuite les acides aminés secondaires (la proline).

La séparation des substances dérivées se fait selon l'hydrophobicité des complexes formés par passage sur une colonne Hypersil C18 à 35°C, par un gradient binaire de

tampon acétate (pH 7,2) - EDTA-triéthyl amine-tétrahydrofurane et tampon acétate (pH 7,2) -méthanol-acétonitrile.

Deux détecteurs sont utilisés en parallèle, un spectrophotomètre à barrettes de diode, réglé à 338 nm pour les dérivés OPA, et 262 nm pour les dérivés FMOC, mesurant des concentrations entre 100 et 1000 μM , et un spectrofluorimètre, réglé à 340/450 nm pour les dérivés OPA, et 266/305 nm pour les dérivés FMOC, mesurant des concentrations entre 10 et 100 μM .

Pour les analyses en milieu lait, en raison de leur faible concentration, tous les acides aminés excepté la proline ont été quantifiés par spectrofluorimétrie. La proline a été quantifiée par spectrophotométrie car les résultats étaient incohérents.

3.7. Recherche des substrats inhibiteurs dans les surnageants de culture

La technique de WDAT (Well Diffusion Agar Test) décrite par Hernandez et al, (2005) a été utilisée.

La souche *S. aureus* SA15 a été inoculée dans 10 ml de bouillon BHI avec 1% de gélose pour avoir une concentration finale de *S. aureus* de 10^5 UFC ml^{-1} . La gélose contenant *S. aureus* a été coulée à la surface d'un milieu gélosé M17. Après 30 min à 4°C, des puits de 6 mm ont été creusés dans les deux couches de gélose. Les puits ont été remplis avec des surnageants concentrés selon la méthode décrite par Hernandez et al, (2005) par centrifugation sur des membranes de seuil de coupure de 3000 Daltons (Vivascience, Hannover, Allemagne). Les surnageants testés provenaient de co-cultures de *L. garvieae* N201, *L. lactis* N658 et *E. faecalis* N516 avec *S. aureus* en milieu TS tamponné.

Après 1 h à 4°C, les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 24 h. Après l'incubation, les zones d'inhibition autour des puits ont été observées.

3.8. Analyse statistique

Les résultats des différentes variables (niveaux de *S. aureus*, pH, concentration en acides aminés, concentrations en L-lactate et acétate) ont été statistiquement analysés par Analyse de Variance ANOVA. Lorsque les moyennes étaient significativement différentes, un test de Newman-Keuls a été réalisé comme il est décrit dans le paragraphe 1.8.

Tableau 15: Composition des différents milieux étudiés pour la croissance de *S. aureus*.

N° de milieu	Nom donné	Composition /l de milieu
1	lait	Lait microfiltré
2	MB*	Tryptone 17g, Peptone pancréatique de caséine 3 g, Extrait de levure 6 g
3	MB 1	Tryptone 17 g, Peptone pancréatique de caséine 3 g, Extrait de levure 6 g, poudre du lait 12 g
4	MB 2	Tryptone 17 g, Peptone pancréatique de caséine 3 g, Extrait de levure 6 g, poudre du lait 6 g
5	MB 3	Tryptone 17 g, Peptone pancréatique de caséine 3 g, Extrait de levure 6 g, poudre du lait 1,2 g
6	TPYC	Tryptone 17 g, Peptone pancréatique de caséine 3 g, Extrait de levure 6 g, Caséine 15 g
7	TPYC+ Cr	Tryptone 17 g, Peptone pancréatique de caséine 3 g, Extrait de levure 6 g, Caséine 15 g, Crème UHT 30 ml
8	CCr	Caséine 40 g, Crème UHT 30 ml

MB= milieu de base

4. Effet de la température et du pH sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en co-culture avec une souche inhibitrice de *Lactococcus garvieae*. "Les résultats correspondant à cette partie seront présentés dans le chapitre 3 de la partie résultats".

S. aureus SA15 a été précultivée dans le milieu BHI modifié avec 12g/l de lait comme il est décrit dans le paragraphe 3.1 et *L. garvieae* N201 a été précultivée comme il est décrit dans le paragraphe 3.2.2. *S. aureus* a été inoculée dans divers milieux, lait, MB, MB1, MB2, MB3, TPYC, TPYCCr et CCr (cf. Tableau 15). La croissance de *S. aureus* dans ces milieux a été comparée. Le milieu TPYC (Tryptone, Peptone, Yeast, Casein) (cf composition en annexe 2) a été choisi car il permet la meilleure croissance de *S. aureus* et *L. garvieae*. Par ailleurs, le pH de ce milieu est plus facile à ajuster aux différentes valeurs de pH (de 5 à 6,8) que le lait.

4.1. Facteurs étudiés

Un plan d'expérience selon une matrice de Doehlert a été construit. La structure de Doehlert (Doehlert 1970) répond à la formule $K^2 + K + 1$ points pour K facteurs: un point est situé au centre, les autres à la périphérie (cf. Figure 3). Le plan comporte 3 facteurs, un des facteurs est étudié à trois niveaux [N201], un à cinq niveaux (T°C) et un à sept niveaux (pH). Dans le plan de Doehlert, les trois facteurs T°C, pH et la concentration de *L. garvieae* sont testés dans 13 conditions (cf. Tableau 16). Le point central (0,0,0) a été répété quatre fois.

Le facteur pH du milieu a été étudié aux 7 niveaux suivants: 5,0; 5,3; 5,6; 5,9; 6,2; 6,5 et 6,8. Les niveaux ont été choisis pour se situer dans la gamme des valeurs de pH observées durant les 24 premières heures de fabrication du fromage, la valeur de pH 6,8 correspondant au pH normal du lait. La valeur de pH de 5,0 se situe en dessous du pH le plus bas (pH 5,2) souhaité en technologie fromagère de type pâte pressée non cuite (Saint-nectaire, Cantal). Le pH de milieu a été ajusté à ces différentes valeurs de pH 5,0; 5,3; 5,6; 5,9; 6,2; 6,5 et 6,8 (cf. Tableau 16) par l'ajout d'acide lactique à 90% (Prolabo, Lyon, France).

Tableau 16 : Combinaisons testées selon le plan de Doehlert

Conditions	Valeur code			Valeur expérimentale		
	N_{N201}	TC	pH	N_{N201}	TC	pH
C1	0,000	1,0	0,000	7,5	34	5,9
C2	0,000	+0,5	+0,866	7,5	30	6,8
C3	+0,816	+0,5	+0,289	9,0	30	6,2
C4	-0,816	+0,5	-0,289	6,0	30	5,6
C5	0,000	+0,5	-0,866	7,5	30	5,0
C6	0,000	-0,5	+0,866	7,5	22	6,8
C7	+0,816	-0,5	0,289	9,0	22	6,2
C8	-0,816	-0,5	-0,289	6,5	22	5,6
C9	0,000	-0,5	-0,866	7,5	22	5,0
C10	-0,816	0,0	0,577	6,0	26	6,5
C11	0,000	0,0	0,000	7,5	26	5,9
C12	0,816	0,0	-0,577	9,0	26	5,3
C13	0,000	-1,0	0,000	7,5	18	5,9

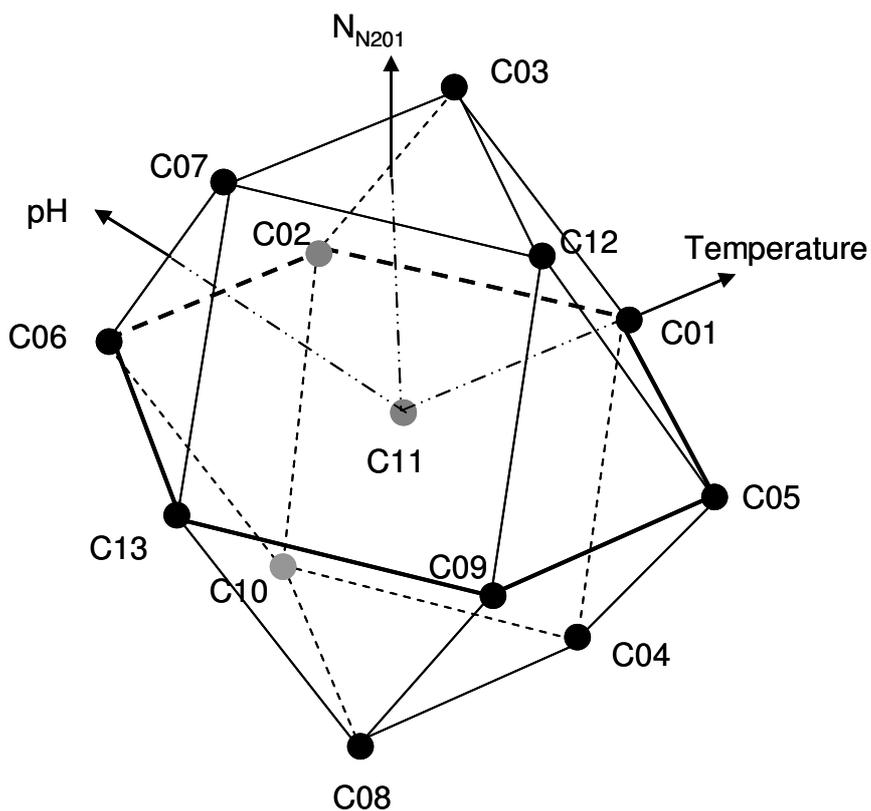


Figure 3 : Plan de Doehlert

Le facteur température a été étudié aux 5 niveaux suivants 18, 22, 26, 30 et 34 °C (cf. Tableau 16). Les niveaux de température ont été choisis en lien avec celles de fabrication du fromage. La température de 34°C correspond à celle de l'emprésurage du lait, 26 °C est celle du caillé après 6 h d'emprésurage et 18 °C est celle du fromage 1 jour après fabrication.

Le facteur concentration de la souche de *L. garvieae* N201 a été étudié à trois niveaux d'inoculation initial 6,0; 7,5 et 9 log₁₀ ufc/ml de milieu. Ces trois concentrations ont été choisies car elles se situent de part et d'autre de la concentration 10⁸ ufc/ml pour laquelle une inhibition a été observée en milieu lait (cf résultats du chapitre 3).

4.2. Dénombrement des microorganismes

S. aureus SA15 et *L. garvieae* N201 ont été dénombrés comme il est décrit dans le paragraphe 3.5.

4.3. Détection des entérotoxines staphylococciques

Après 48 h d'incubation, les entérotoxines (A-E) ont été dosées par le LIAL comme décrit dans le paragraphe 1.7. Lorsque le test était positif à 48 h, les entérotoxines ont été recherchées dans les autres échantillons à 3, 6, 9 et 24 h.

4.4. Mesure du pH

Les valeurs de pH de milieu ont été mesurées avec un pH-mètre comme décrit précédemment (cf. 1.5).

4.5. Analyse statistique et interprétation des résultats

Des analyses de régressions multiples basées sur la méthode des moindres carrés ont été effectuées à l'aide du logiciel Statistica software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) pour étudier les effets du pH, de la température et de la concentration initiale de *L. garvieae* sur la croissance de *S. aureus*. Les effets linéaires et quadratiques de ces trois facteurs et leurs interactions ont été analysés. L'importance des coefficients a été évaluée par le test de Fischer (F) avec différentes valeurs de variances (P < 0.05, P < 0.01 et P < 0.001).

5. Interaction entre *Staphylococcus aureus* et *Lactococcus garvieae* et la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). "Les résultats correspondant à cette partie seront présentés dans le chapitre 4 de la partie résultats".

5.1 Sensibilité de différentes souches de *S. aureus* à l'H₂O₂

Six souches de *Staphylococcus aureus* (SA15, ps 87, ps 219, ps 332, ps 325 et ps 196) d'origines diverses et de profils génomiques VNTR différentes (Callon et al., 2007) (cf. Tableau 14) ont été sélectionnées pour étudier leur sensibilité à différentes concentrations d'H₂O₂. Les souches ont été précultivées comme décrit dans le paragraphe 3.2.2. Chaque souche a été inoculée à une concentration de 1500 ufc/ml de milieu BHI tamponné à pH 6,8 et additionné d'H₂O₂ à différentes concentrations (0, 1, 2, 3 et 4 mmol/l). La concentration de 1500 ufc/ml a été choisie pour pouvoir quantifier l'éventuelle diminution du niveau de *S. aureus*. Les cultures ont été incubées à 24 et 30°C pendant 24 h.

Après 3, 6 et 24 h d'incubation dans le milieu BHI à différentes concentrations d'H₂O₂, *S. aureus* a été dénombré sur le milieu RPFA comme il est décrit dans le paragraphe 3.5.

5.2. Activité catalasique des "cellules au repos" de *S. aureus* SA15

L'activité catalasique des cellules de SA15 en culture seule ou en co-culture avec la souche *L. garvieae* N201 a été déterminée selon la méthode décrite par Talon et al, (1999). Les cultures de *S. aureus* ont été concentrées par centrifugation (10000 rpm pendant 15 min à 4 C°) pour avoir une concentration de 10⁸ ufc/ml. 0,1 ml de suspension du culot à 10⁸ ufc/ml a été mélangé avec 2,9 ml d'une solution de 30 mM d'H₂O₂ préparée dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,0. L'évolution de la densité optique à 240 nm a été enregistrée pendant 10 min, puis l'activité catalasique a été mesurée lorsque la vitesse de variation de la densité optique (Δ DO/min) était régulière pendant 3 min. L'activité catalasique est calculée en fonction du Δ DO/min et exprimée en μ mol H₂O₂/min pour 10⁷ ufc/ml de SA15.

5.3. Production de peroxyde d'hydrogène par des souches de *L. garvieae*, *L. lactis* et *Enterococcus faecalis*

La capacité de quatre souches de *L. garvieae*, trois souches de *L. lactis* et une souche d'*E. faecalis* (cf. 3.2.1) à produire de l' H_2O_2 a été évaluée. Les souches ont été précultivées dans un bouillon M17 comme indiqué dans le paragraphe 3.3. Chaque souche a été inoculée à une concentration de 10^8 ufc/ml de milieu BHI tamponné à pH 6,8. Après 9 et 24 h d'incubation à 30°C au Bain-Marie sans agitation, la concentration d' H_2O_2 dans les surnageants de culture a été quantifiée selon la méthode décrite dans le paragraphe 3.5.7.

5.4. Effet de l'agitation sur la production de H_2O_2 par *L. garvieae* N201

La production d' H_2O_2 par *L. garvieae* N201 a été étudiée en culture sans agitation ou en culture sous agitation de 150 rpm à 30°C. Après 0, 3, 6, 9 et 24 h d'incubation, *L. garvieae* a été dénombrée comme il est décrit dans le paragraphe 3.5. La concentration de H_2O_2 dans les surnageants de cultures de *L. garvieae* a été déterminée comme décrit dans le paragraphe 5.7.

5.5. Co-culture de *S. aureus* avec *L. garvieae*

Les souches ont été précultivées comme décrit dans le paragraphe 2.2 pour *S. aureus* et dans le paragraphe 3.3 pour *L. garvieae* N201. Elles ont été ensuite inoculées en milieu BHI tamponné à pH 6,8 (pH de lait). La concentration initiale de *S. aureus* était de 150 ufc/ml et celle de *L. garvieae* était de 10^8 ufc/ml. *S. aureus* et *L. garvieae* en culture seule ou en co-culture ont été incubées à 18, 24 et 30°C au Bain-Marie sans agitation. Des prélèvements ont été effectués après 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 et 24 h d'incubation. Cette expérimentation a été répétée trois fois.

5.6. Effet de la température de culture sur l'activité catalasique des "cellules au repos"

L'effet de la température de culture des souches sur la synthèse de catalase a été étudié en cultivant *S. aureus* en BHI tamponné à pH 6,8 à différentes températures. L'activité catalasique des cellules au repos récoltées après 6, 9, 12, 15, 18, 21 et 24 h a été mesurée comme décrit dans le paragraphe 5.2.

5.7. Détermination de la concentration de peroxyde d'hydrogène

La concentration d'H₂O₂ dans les surnageants (9600 x g, 10 min à 4°C) de culture de *L. garvieae* N201 seule ou en co-culture avec *S. aureus* à pH 6,8 a été mesurée par la méthode décrite par Yang et Ma (2005). Un volume de 150 µl d'ABTS (2,2 Azino-bis- 3 ethylbenzthiazoline-6- sulfonic acid) (Sigma, Steinheim, Allemagne) a été ajouté à 1 ml du surnageant de culture. 25 µl d'enzyme peroxydase (horseradish peroxydase) (1 mg/ml) (Sigma, Steinheim, Allemagne) ont alors été ajoutés. Le mélange a été incubé à température ambiante pendant 5 min. La densité optique a été ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (HITACHI U-2000, Allemagne) à 725 nm. Les concentrations d'H₂O₂ ont été calculées par rapport à une gamme étalon préparée dans le milieu BHI tamponné à pH 6,8 pour une gamme de concentration de 0 à 6 mmol/l obtenue par dilution d'une solution d'H₂O₂ à 30%.

5.8. Effet de l'ajout de catalase exogène sur l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*

L'effet d'ajout de catalase exogène sur l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* a été étudié en milieu BHI tamponné à pH 6,8. Les souches *S. aureus* (SA15) et de *L. garvieae* N201 ont été préparées etensemencées comme décrit dans le paragraphe 5.3. Différentes concentrations de catalase (0, 500, 1000, 2000, et 4000 IU/ml) ont été ajoutées à la co-culture de *S. aureus* avec *L. garvieae*. Les cultures ont été incubées à 24 et 30°C en Bain-Marie sans agitation. L'expérimentation a été répétée trois fois.

5.9. Dénombrement de *S. aureus* et *L. garvieae*

Les souches de *S. aureus* (SA15) et *L. garvieae* (N201) ont été dénombrées comme il est décrit dans le paragraphe 3.5.

5.10. Analyse statistique

Les numérations de *S. aureus* en fonction des concentrations d'H₂O₂, catalase et l'effet de l'agitation du milieu ont été statistiquement analysées par Analyse de Variance ANOVA. Lorsque les moyennes étaient significativement différentes, un test de Newman-Keuls a été réalisé comme il est décrit dans le paragraphe 1.8.

RESULTATS

La partie relate les **résultats** obtenus, elle est composée de 5 chapitres qui suivent la chronologie du travail.

Le premier chapitre relate les résultats obtenus sur la croissance de *Staphylococcus* à coagulase positive et la production d'entérotoxines dans des fromages fermiers AOC Saint-Nectaire.

Le deuxième chapitre porte plus particulièrement sur l'effet des souches de *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* et *Enterococcus faecalis* sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en lait microfiltré.

Les travaux présentés dans **le troisième chapitre** ont pour objectif de préciser l'effet de la température et du pH sur la croissance de *Staphylococcus aureus* en co-culture avec une souche inhibitrice de *Lactococcus garvieae*.

Le quatrième chapitre concerne le rôle du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans l'inhibition de *Staphylococcus aureus* par *Lactococcus garvieae*.

Le cinquième chapitre discute l'ensemble des résultats et énonce quelques perspectives.

CHAPITRE 1

Croissance des *Staphylococcus* à coagulase positive (SC+) et production d'entérotoxine pendant la fabrication du fromage A.O.C Saint-Nectaire.

***Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin Production during Manufacture of Non-Cooked, Semi-Hard Cheese from Cow's Raw Milk.**

Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F. and Montel, M.C.

J. Food. Prot. 2006, 69, 2161-2167.

Tableau 17 : Types de levain lactique inoculé et conditions d'emprésurage

Exploitations et campagne	Dose de présure mL/100 L	Température à l'emprésurage °C	Durée de coagulation totale (min)	Type du levain lactique	Composition de levain lactique
EX1-1	30	33	32	DISCHAMPS	NC
EX1-2	30	33	32	DISCHAMPS	NC
EX2-1	27,5	34,2	40	JOINTEC B12	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
EX2-2	27,5	33,5	40	JOINTEC203	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
EX3-1	30	34,4	30	MY800	<i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
EX3-2	30	34	30	MY800+MA400	(MA400)(<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>)
EX4-1	30	33	45	Affineur	NC
EX4-2	30	33,6	45	Affineur	NC

EX1-1= Exploitation 1-prélèvement d'hiver; **EX1-2=** Exploitation 1- prélèvement d'été. **EX2-1=** Exploitation 2- prélèvement d'hiver; **EX2-2=** Exploitation 2- prélèvement d'étéetc.

NC= non communiqué.

Chapitre 1: Croissance des *Staphylococcus* à coagulase positive (SC+) et production d'entérotoxine pendant la fabrication du fromage A.O.C Saint-Nectaire.

1.1. Objectif

Cette première partie de thèse avait pour objectif d'évaluer la croissance des populations *Staphylococcus* coagulase positive SC+ et leur production d'entérotoxines dans des fromages fermiers A.O.C Saint-nectaire en lien avec l'évolution du pH et des autres populations microbiennes. Dans ce but, la croissance des SC+ a été suivie dans des fromages fabriqués en hiver et en été dans quatre exploitations fermières de la zone Saint-nectaire.

1.2. Méthodologie

Le matériel et méthode correspondant à cette partie est détaillé dans les paragraphes 1.1 à 1.8.

1.3. Résultats

L'ensemble des données obtenues sur des fromages AOC Saint-nectaire fermier ont également été intégrés avec des données sur les fromages expérimentaux de type Saint-Nectaire et des fromages AOC Salers dans une publication dans *Journal of Food Protection*. Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F., Montel, M.C. (2006) "*Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin Production during Manufacture of Non-Cooked, Semi-Hard Cheese from Cow's Raw Milk." *J. Food. Prot.* 69, 2161-2167.

Les principaux résultats relatifs au fromage AOC Saint-nectaire seront résumés dans les paragraphes suivants.

1.3.1. Paramètres technologiques de fabrication

La nature des ferments lactiques inoculés et les conditions d'emprésurage sont résumées dans le tableau 17. La composition des ferments lactiques varie d'une exploitation à l'autre: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (bactéries lactiques thermophiles) sont systématiquement présents. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*; *Lactococcus lactis*

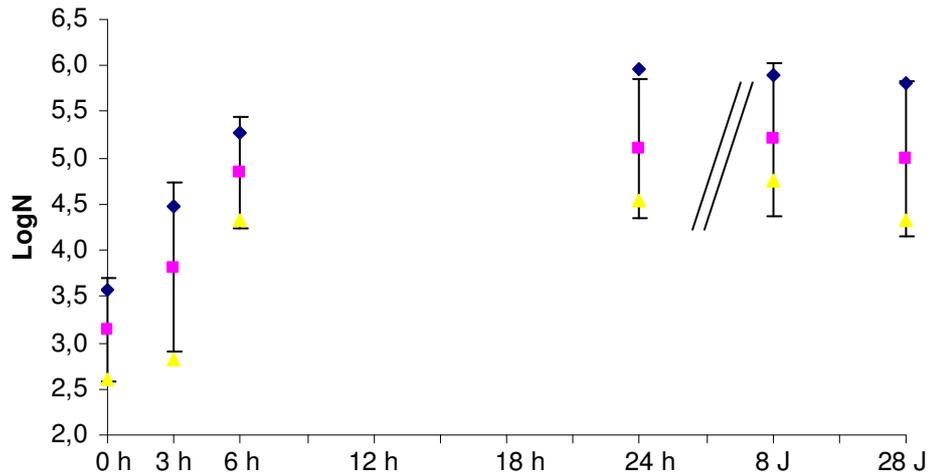


Figure 4: Niveaux de *Staphylococcus coagulase positive* (SC+) dans des fromages AOC Saint-Nectaire pendant les premières 24 h de fabrication puis après 8 jours et 28 jours d'affinage. Les niveaux de SC+ sont exprimés en LogN ufc/ml de lait ou LogN ufc/g de fromage. Pour tenir compte de la concentration d'un facteur 10 en fromages, les niveaux en SC+ en lait ont multipliés par 10.

- ◆ : Données du fromage avec le niveau le plus élevé de SC+ à 0 h (Exploitation 2).
- : Moyenne des données des niveaux des 8 fromages (2 fromages (été, hiver) de 4 exploitations).
- ▲ : Données du fromage avec le niveau le plus faible de SC+ à 0 h (Exploitation 1).

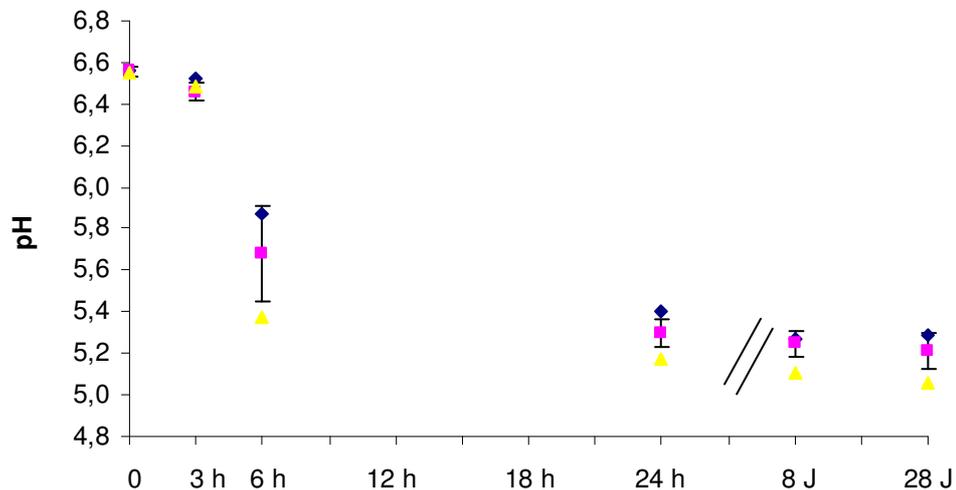


Figure 5: Evolution des valeurs de pH dans des fromages AOC Saint-Nectaire pendant les premières 24 h de fabrication puis après 8 jours et 28 jours d'affinage.

- ◆ : Valeurs de pH des fromages avec le pH le plus élevé (Exploitation 2).
- : Moyennes des données de pH des 8 fromages (2 fromages (été, hiver) de 4 exploitations).
- ▲ : Valeurs de pH des fromages avec le pH le plus bas (Exploitation 3).

subsp. *cremoris*; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* sont aussi rajoutés dans certaines fabrications. La durée de coagulation varie de 30 à 45 min et la température d'emprésurage se situe entre 33 et 34,4°C.

1.3.2. Evolution des populations SC+

Les niveaux de population des SC+ dans les laits des quatre exploitations se situent entre 1,61 log₁₀ ufc/ml de lait (exploitation 1) et 2,57 log₁₀ ufc/ml de lait (exploitation 2) avec une valeur moyenne de 2,14 log₁₀ ufc/ml (cf. Figure 4).

La figure 4 montre l'évolution des populations SC+ (dénombrement sur RPFA) durant la fabrication et l'affinage. Quelles que soient les exploitations fermières, les courbes d'évolution des SC+ dans les fromages sont relativement similaires. La population de SC+ augmente fortement les 6 premières heures (la moyenne d'accroissement est de 1,7 log₁₀ ufc/g entre 0 et 6 h de fabrication) en tenant compte du facteur de concentration cellulaire de 10 dans le caillé par rapport au lait. L'augmentation pendant le premières 6 heures, varie de 1,47 log₁₀ ufc/g (fromages de l'exploitation 4) à 1,93 log₁₀ ufc/g (fromages de l'exploitation 3). Elle est moins importante entre 6 et 24 h d'incubation ($\Delta = 0,26$ log₁₀ ufc/g). Le niveau maximal après 24 h de fabrication, se situe entre 4,55 log₁₀ ufc/g valeur la plus faible pour l'exploitation 1 et 5,96 log₁₀ ufc/g la plus forte pour l'exploitation 2. Les niveaux maximaux des SC+ sont similaires pour les fromages d'hiver et d'été pour les exploitations 1, 2 et 4. Le niveau de SC+ des fromages d'hiver de l'exploitation 3 est inférieur à celui des fromages d'été.

1.3.3. Evolution du pH et de l'extrait sec

L'évolution de pH de fromages est montrée dans la figure 5. Il diminue durant les six premières heures, les valeurs moyennes du pH à 6 heures se situent entre 5,41 unités (fromages de l'exploitation 3) et 5,91 unités (fromages de l'exploitation 2). A 24 h, les valeurs de pH sont comprises entre 5,22 unités (fromages de l'exploitation 3) et 5,36 unités (fromages de l'exploitation 1). Elles ne varient pas en cours d'affinage.

L'extrait sec des fromages (cf. Annexe 4) évolue surtout durant les premières 24 h de fabrication. Il se situe entre 49,84% dans les fromages de l'exploitation 1 et 51,79% dans les fromages de l'exploitation 2 après 24 h.

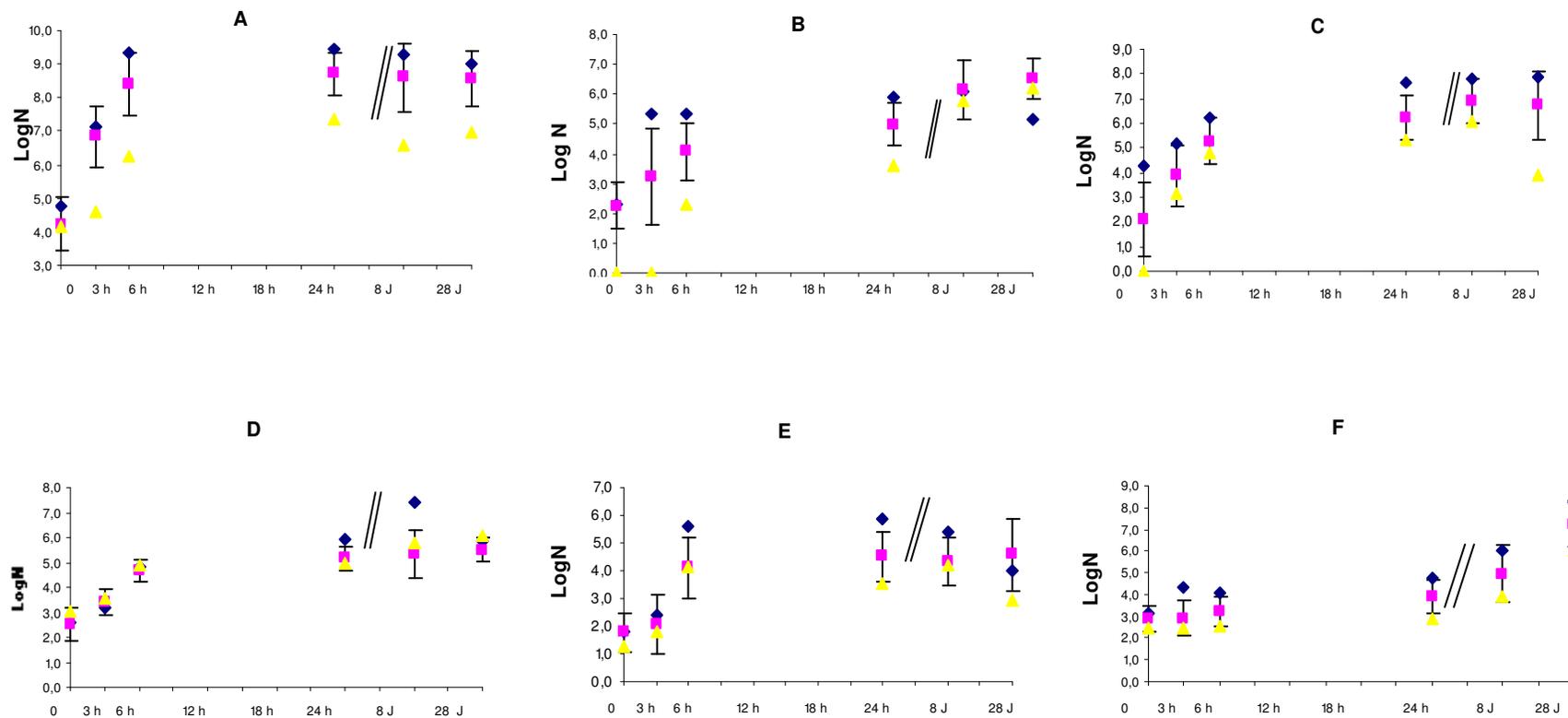


Figure 6: Niveaux des flores microbiennes dans des fromages AOC Saint-Nectaire pendant les premières 24 h de fabrication puis après 8 jours et 28 jours d'affinage.

Les niveaux des flores microbiennes sont exprimés en LogN ufc/ml de lait ou LogN ufc/g de fromage. Pour tenir compte de la concentration d'un facteur 10 en fromages, les niveaux des flores microbiennes des laits ont multipliés par 10. **A** = flores thermophiles sur M17 à 42°C; **B**= *Leuconostoc* dextrane+ sur MSE; **C**= population de colonies rouges sur Turner; **D**= flore cultivable sur SB; **E**= flore cultivable sur VRBG; **F**= *Lactobacillus* sur FH.

■ : Moyennes des données de pH des 8 fromages (2 fromages (été, hiver) de 4 exploitations); ◆ : Données du fromage avec le niveau le plus élevé de la flore considérée à 24 h; ▲ : Données du fromage avec le niveau le plus faible de la flore considérée à 24 h.

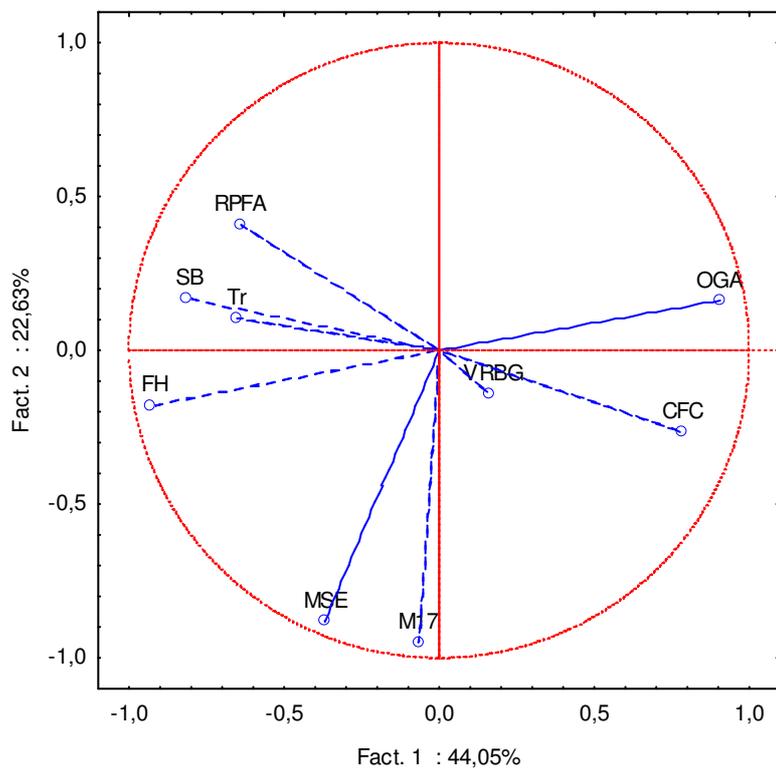
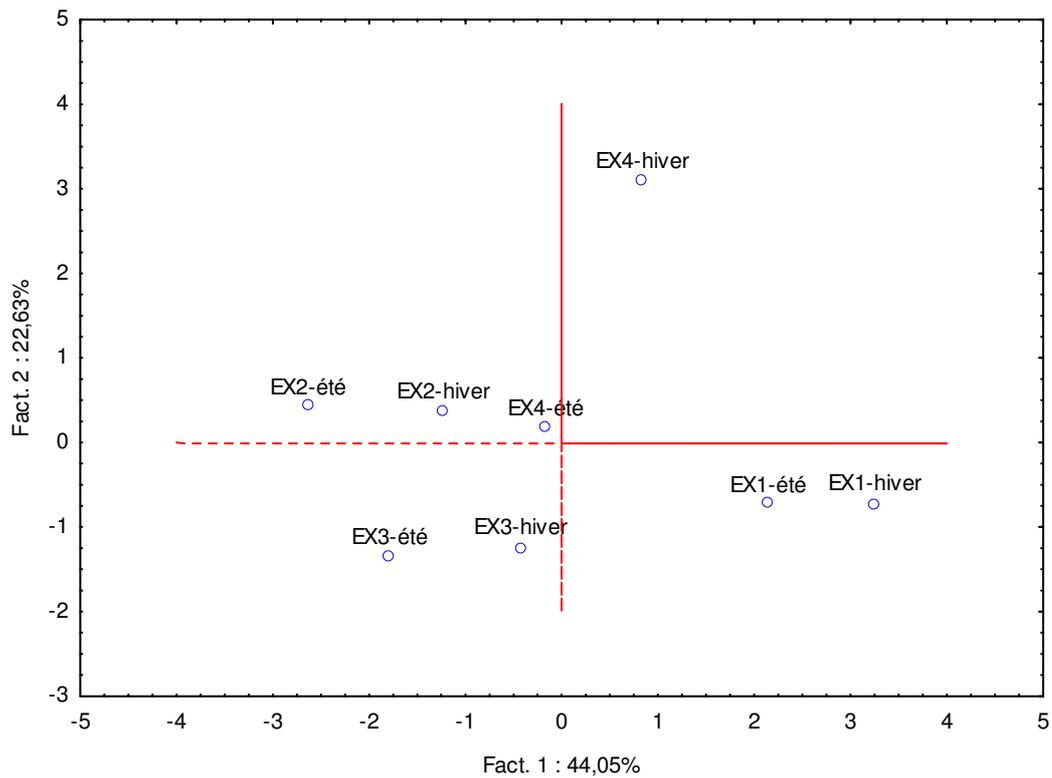


Figure 7: Analyse en Composantes Principales des flores dans les fromages à 24 h, en prenant en compte des numérations microbiennes sur milieu M17, milieu MSE, milieu FH, milieu Turner (Tr), milieu SB, milieu VRBG, milieu CFC, milieu OGA et milieu RPFA. (cf. Tableau 13 et annexe 1)
 EX1= Exploitation 1; EX2= Exploitation 2; EX3= Exploitation 3 ; EX4= Exploitation 4.

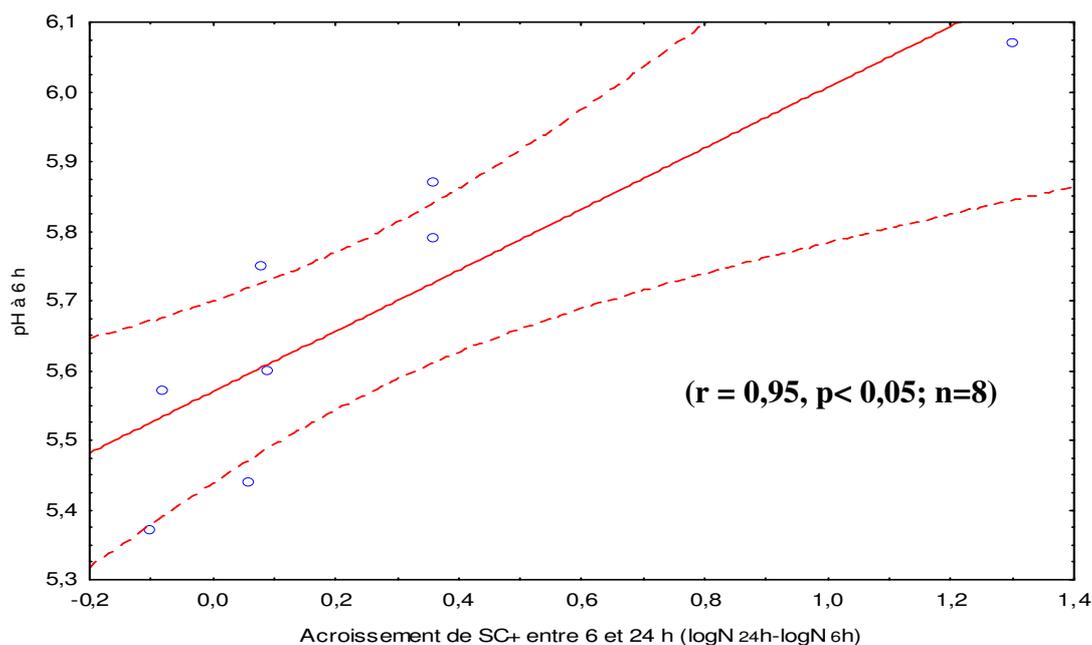


Figure 8: Relation entre l'accroissement des *Staphylococcus* coagulase positive entre 6 et 24 h et les valeurs de pH à 6 h. L'accroissement de SC+ entre 6 et 24 h = (LogN 24 h –LogN 6 h).

Tableau 18: Corrélations entre la croissance de *Staphylococcus* coagulase positive et les niveaux des flores microbiennes dénombrées sur différents milieux et l'extrait sec de fromage.

	Temps (h)	Croissance de SC+ (Δ)		
		LogN 3h – LogN 0 h	LogN 6h – LogN 0 h	LogN 24h – LogN 0 h
M17 (à 30°C)	3	0,19		
	6		0,75	
	24			0,52
MSE+	3	0,07		
	6		0,49	
	24			0,33
MSE-	3	0,81		
	6		0,25	
	24			0,36
Turner	3	0,81		
	6		0,63	
	24			0,06
FH	3	0,21		
	6		0,43	
	24			0,10
ES%	3	0,24		
	6		0,44	
	24			0,14

Les corrélations sont calculées à partir des données de 8 fromages ($p < 0,5$). M17= flore cultivable sur milieu M17, MSE + = *Leuconostoc dextrane+*, MSE-= *Leuconostocs* et flore lactique, Turner= flore cultivable sur milieu Turner (Colonie rouge), FH= *Lactobacillus*, ES % = extrait sec en%.

1.2.4. Evolution des autres populations microbiennes

Les populations de bactéries thermophiles (dénombrement sur milieu M17 à 42°C), de *Leuconostoc* producteurs de dextrans (dénombrement sur milieu MSE), de *Lactococcus* (dénombrement sur milieu Turner), d'*Enterococcus* (dénombrement sur milieu SB), d'Entérobactéries (dénombrement sur milieu VRBG) et de *Lactobacillus* (dénombrement sur milieu FH) évoluent comme il est indiqué dans la figure 6. Toutes les populations atteignent leur niveau maximal pendant les premières 24 h de fabrication sauf la population de bactéries lactiques sur milieu MSE et celle sur milieu FH qui se développent tout au long d'affinage.

L'Analyse en Composante Principale (ACP) des niveaux de flores bactériennes, levures et moisissures (cf. Figure 7) à 1 jour de fabrication montre que:

- les fromages de l'exploitation 1 possèdent un faible niveau en *Staphylococcus* coagulase positive et des niveaux importants en *Pseudomonas* et en flore cultivable sur milieu CFC et sur milieu OGA,
- les fromages de l'exploitation 2 sont caractérisés par des niveaux importants en *Staphylococcus* coagulase positive et en flore cultivable sur milieu SB et milieu Turner,
- les fromages de l'exploitation 3 sont caractérisés par des niveaux importants de flore cultivable sur milieu M17, sur milieu MSE (*Leuconostocs* dextrane+) et sur milieu FH (*Lactobacillus*). L'utilisation de ferments contenant *Lactococcus* n'entraîne pas de niveaux plus importants de ce genre sur le milieu Turner.
- une plus grande variabilité des flores microbiennes a été observée entre l'été et l'hiver pour les fromages de l'exploitation 4. Le fromage d'hiver a un niveau faible en flore.

1.3.5. Corrélation entre les variables

Les niveaux de population des *Staphylococcus* coagulase positive à 6 h, 1j et 8 jours et ceux du lait sont fortement corrélés avec des coefficients de corrélation respectivement de 0,96; 0,77; 0,81 ($p < 0,5$, $n = 8$).

L'accroissement de population des SC+ entre 6 et 24 h est corrélé à la valeur de pH à 6 h ($r = 0,95$; $p < 0,5$, $n = 8$) (cf. Figure 8). Il n'y a pas de relation entre le pH et les deltas de croissance à 3 h ($r = -0,18$; $p < 0,5$, $n = 8$), 6 h ($r = -0,44$; $p < 0,5$, $n = 8$) et

après 8 jours d'affinage ($r = - 0,03$; $p < 0,5$, $n = 8$). Les corrélations avec les autres flores microbiennes cultivables sur différents milieux sont données dans le tableau 18. Il n'y a pas de corrélation négative entre la croissance de SC+ après 3, 6 et 24 h et les niveaux de flores sur tous les milieux. Par contre, l'accroissement de la population de SC+ entre 0 et 3 h est associé à un niveau de flore élevé sur milieu MSE et Turner. La croissance de SC+ et l'extrait sec des fromages ne semble pas corrélée. Il est difficile d'établir un lien entre le développement de *S. aureus* et les conditions de fabrication (emprésurage et type de levain lactique utilisé).

1.2.6. Production d'entérotoxines

Aucun fromage ne contenait d'entérotoxines dosables par le kit Transia.

1.3. Conclusion

Nos résultats nous ont permis d'identifier les stades durant lequel *S. aureus* se multiplie et quelques leviers d'action pour contrôler son développement. *S. aureus* se multiplie essentiellement durant les premières six heures d'incubation. Le contrôle du niveau des *Staphylococcus* à coagulase positive dans le lait devrait être intégré dans un plan de maîtrise puisque le niveau maximal de *S. aureus* atteint dépend du niveau initial dans le lait. Le pH à 6 h de fabrication devrait également être contrôlé car il interviendrait sur le niveau maximal atteint. Ces résultats ont été confirmés dans des fromages expérimentaux de type Saint-nectaire et dans des fromages AOC Salers comme il est précisé dans l'article inclus dans les pages suivantes. Ils corroborent ceux de la littérature sur une croissance rapide de *S. aureus* en début de fabrication durant les 24 premières heures.

Des niveaux élevés de *Staphylococcus* à coagulase positive à 6 h ont été associés à des niveaux élevés en d'autres flores lactiques. Ces résultats ne sont pas confirmés en intégrant les données des fromages expérimentaux de type Saint-nectaire et des fromages AOC salers.

Sur la base de nos résultats, plusieurs hypothèses pourraient être formulées pour expliquer la multiplication des *Staphylococcus* à coagulase positive durant les premières heures de fabrication du fromage.

- Les difficultés de dénombrement de *S. aureus* en milieu lait (B Poutrel, communication personnelle), nous ont amené à formuler l'hypothèse que le

niveau de *S. aureus* dans le lait pouvait être sous estimé. Cette sous estimation entraînerait un accroissement apparemment important dans le caillé et dans le fromage.

- La deuxième hypothèse est que la présure stimulerait la croissance de *S. aureus*.

La vérification de ces premières deux hypothèses est présentée dans la partie travaux complémentaires.

- La troisième hypothèse associe la croissance de *S. aureus* en début de fabrication à des conditions physiologiques -pH, température- favorables. Elle est étayée par des données de la littérature montrant la sensibilité de *S. aureus* au pH et à la température. En effet, les diminutions de pH et des températures comprises entre 6,5 et 5,2 pour le pH et entre 34 et 18°C pour la température en cours de fabrication limiteraient la croissance de *S. aureus*. L'effet de ces paramètres sur la croissance de *S. aureus* sera précisé dans le chapitre 3.

L'absence de corrélation négative entre le niveau de SC+ et celui d'autres flores microbiennes n'a pas permis d'émettre des hypothèses sur le rôle antagoniste de certaines populations vis-à-vis de *S. aureus*. Par conséquent, dans le but de contrôler *S. aureus* par biopréservation, nous avons choisi de poursuivre notre étude en exploitant les potentialités inhibitrices de la collection de souches de bactérie lactique du laboratoire. Sur la base de résultats antérieurs obtenus au laboratoire (Florentin, 2000), nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux populations de *Lactococcus*. L'effet inhibiteur de souches de *Lactococcus lactis*, de *Lactococcus garvieae* et d'*Enterococcus* sera développé dans le chapitre 2.

***Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin Production during the Manufacture of Uncooked, Semihard Cheese from Cows' Raw Milk**

CELINE DELBES,^{1*} JOMAA ALOMAR,¹ NADIA CHOUGUI,¹ JEAN-FRANÇOIS MARTIN,² AND MARIE-CHRISTINE MONTEL¹

¹INRA, Unité de Recherches Fromagères, Aurillac, F-15000 France; and ²INRA, Unité de Recherche Maladies Métaboliques et Micronutriments, Saint-Gènes-Champagne, F-63122 France

MS 06-004: Received 5 January 2006/Accepted 22 March 2006

ABSTRACT

Staphylococcus aureus growth and enterotoxin production during the manufacture of model Saint-Nectaire, Registered Designation of Origin Saint-Nectaire, and Registered Designation of Origin Salers cheeses, three types of uncooked, semihard, raw milk cheese, were investigated. Coagulase-positive staphylococci (SC⁺) grew rapidly during the first 6 h. Between 6 and 24 h, counts increased by less than 0.5 log CFU/ml. Raw milk counts ranged from undetectable (<10 CFU/ml) to 3.03 log CFU/ml. Maximal levels reached in cheese on day 1 ranged from 2.82 to 6.84 log CFU/g. The level of SC⁺ after 24 h was mainly influenced by the milk baseline SC⁺ level (correlation coefficient, $r > 0.80$) but pH at 6 h influenced the SC⁺ growth observed between 6 and 24 h ($r > 0.70$). Thus, the initial level of SC⁺ in raw milk should be maintained below 100 CFU/ml and best below 40 CFU/ml. To limit growth, acidification should be managed to obtain pH values around or below 5.8 at 6 h in Saint-Nectaire cheeses and around or below 6.3 at 6 h in Salers cheeses. Enterotoxins were only detected in two Salers cheeses whose SC⁺ counts on day 1 were 5.55 log CFU/g and 5.06 log CFU/g, respectively, and whose pH values at 6 h were high (approximately 6.6 and 6.5, respectively).

Staphylococcus aureus is a ubiquitous organism commonly isolated from bulk raw milk and milk of dairy cattle suffering from mastitis (12, 29). Its presence in raw milk is a major concern for the safety and quality of traditionally produced cheeses. *S. aureus* is reported in France as the most frequent pathogen involved in foodborne diseases associated with raw milk cheese (2). Some *S. aureus* strains among natural populations may produce staphylococcal enterotoxins (SEs), which have recently been responsible for food poisoning associated with reconstituted milk in Japan (10) and cheese consumption in European countries (6) and Brazil (27). Until 2005, risk assessment relied on coagulase-positive staphylococci (SC⁺) quantification in cheese at the time of production release. New European standards, gathered together in the so-called hygiene package, applicable as of 1 January 2006 (EC regulation no. 852-853/2004), require that control analyses be performed at the time when the *S. aureus* count is expected to be the highest, rather than upon production release. This change was based on the fact that SEs may be produced in cheese if sufficient levels of *S. aureus* were reached during the initial growth phase, even if the *S. aureus* levels decreased sharply during cheese ripening. The “M-value” above which cheese quality is considered to be defective is 5 log CFU/g. If values above 5 log CFU/g are detected, the cheese batch has to be tested for SEs. Although no simple relationship can be established between *S. aureus* counts and SE production (15),

data on the peak levels of *S. aureus* reached in cheese are considered critical in assessing the risk of SE production.

The behavior of *S. aureus* in some cheese varieties has been investigated, most often by inoculating variable levels of *S. aureus* strains in milk, between 2 and 6 log CFU/ml (1, 9, 13, 18), sometimes focusing more specifically on the behavior during cheese ripening and storage of cheese (4, 5). The first 24 h of the cheese-making process appeared critical for *S. aureus* growth in a number of raw milk cheeses such as Moroccan traditional fresh cheese (9), semihard cheese (1, 26), and Camembert-type cheese from goats' milk (18). Enterotoxin production in cheese was most often evaluated in cheese made from milk artificially contaminated with enterotoxin-producing strains (5, 18, 23, 26). SEs were detected in cheese only when the enterotoxigenic strains had reached 10⁷ CFU/g. Very few reports are available on the actual production of SEs in cheese by *S. aureus* populations naturally present in raw milk.

For each cheese variety, different technological parameters (e.g., starter culture, acidification kinetics, and pressing) are applied during the cheese-making process. Many factors such as NaCl concentration, pH, and temperature affect the growth of *S. aureus* and enterotoxin production in culture media (7, 8, 30). Meyrand et al. (20) hypothesized that the lower pH recorded during production of lactic cheese in comparison to Camembert-type cheese could explain the disappearance of *S. aureus* from the former.

Guidelines for herd management and hygiene during milk production have led to reduced *S. aureus* prevalence

* Author for correspondence. Tel: 33 (0) 4 71 45 64 19; Fax: 33 (0) 4 71 45 64 13; E-mail: cdelbes@clermont.inra.fr.

in raw milk. To go a step further and meet new EU standard requirements, studies are necessary to characterize *S. aureus* growth in each cheese variety and so define the most suitable sampling time for control analyses. This study was aimed at characterizing the growth characteristics and potential for enterotoxin production of *S. aureus* during the manufacture of three types of uncooked, semihard cheeses made from raw milk, including Registered Designation of Origin (RDO) Saint-Nectaire, model Saint-Nectaire cheese, and RDO Salers cheeses.

MATERIALS AND METHODS

Cheese manufacturing. All milks used were cows' raw milk from morning milking, produced in the mid-mountainous area of Massif Central (France). The milk protein content was approximately 31 g/liter and the fat content ranged between 27.6 and 39.5 g/liter.

RDO Saint-Nectaire (SN) farm cheese. A total of eight cheese-making batches from four farm productions were sampled twice at a 3-month interval, in winter and spring, for analysis. Milk was inoculated immediately after milking with a commercial starter culture, varying according to the farm. Raw milk was coagulated by adding calf rennet (27.5 to 30 ml/100 liter). After coagulation, the curd was cut into small pieces (ca. 0.5 cm) and gently stirred, then it was gathered, filled into molds, and prepressed for 10 min to remove whey. Salt (30 to 40 g/kg) was added on the surface of each cheese and pressing was completed at 23 to 26°C for 6 h. Farm cheeses were 1.7 kg. Cheeses were ripened at 10 to 12°C for 28 days.

Model Saint-Nectaire (mSN) cheese. Twelve model cheeses were prepared from raw milk originating from three farms sampled four times over a 1-month period in the winter. Raw milk was collected from the farms immediately after milking, cooled at 4°C, and transferred to the experimental cheese plant (INRA, URJ, Aurillac) within 2 h. Milk was placed into 5-liter vats and reheated to 33°C. The commercial MY800 starter culture (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis*, and *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* [Texel, Dangé-Saint-Romain, France]) was used to inoculate each vat (0.6%, vol/vol). Rennet was added at 1.51 g/liter (Beaugel 520 mg/liter of chymosin). Coagulation proceeded for about 45 min and then the curd was cut, prepressed, and filled into molds and draining was completed under 3-bar pressure. After 2 h of pressing, 20 g of salt was added to each cheese and pressing was continued for 13 h. Model cheeses were 500 g. Ripening took place at 10°C and 96% relative humidity for 28 days.

RDO Salers (SA) farm cheese. A total of 29 cheese-making batches were analyzed. They originated from three farms that were sampled three times over spring and summer and from 20 farms each sampled once during summer. Milk was processed immediately after milking. For 10 cheese-making batches, milk was inoculated with commercial starter culture, varying according to the farm. Raw milk was coagulated by adding calf rennet. After coagulation, the curd was cut into small pieces (ca. 1 cm) then it was gathered and pressed under an increasing pressure starting from around 1.4 up to 8 bars over about 90 min to remove whey. The dry curd was matured for 18 to 24 h depending on the farm. The curd was milled and salted (2.2 to 2.3% of salt). Further maturation occurred during storage at 16 to 18°C for 2 to 4 h. For each cheese, 42 kg of salted curd was filled into a hoop for pressing. Cheeses were pressed at 12 to 15°C for 48 h and turned

several times. Cheeses were ripened during 5 months at 10 to 13°C.

Milk and cheese samples. Samples were taken from raw milk, 6-hour cheese, and then from cheese after 1, 30, 90, and 150 days of ripening, with aseptic instruments. Subsamples were stored at 4°C and analyzed within 24 h for SC⁺ count and the remainder stored at -20°C for further microbiological tests and to investigate enterotoxin production.

Physicochemical analyses of milk and cheese samples. Milk and cheese pH were determined with a 926 VTV pH meter with an Ingold 406 MX penetration electrode (Mettler-Toledo S.A., Viroflay, France). Dry matter content was determined according to AFNOR standard NF V04-282 (12/95).

Microbiological analyses of milk and cheese samples. Cheese samples were emulsified in sterile phosphate buffer (2% [wt/vol]) and blended in a stomacher lab blender (Seward Medical, London, UK) for 4 min. The suspension was diluted with Ringer's solution and examined for microbial populations by the spread plate procedure. Coagulase positive staphylococci were enumerated on rabbit plasma fibrinogen agar (RPFA) (EN ISO 6888-2) (3) incubated for 24 h at 37°C. Terzaghi and Sandine M17 agar medium plates (31) were incubated either at 30°C (mesophilic bacterial populations) or at 42°C (thermophilic bacterial populations). Lactococci were enumerated on Turner-Sandine-Ellicker (TSE) agar media with nalidixic acid (32), facultatively heterofermentative (FH) lactobacilli on agar described by Isolini et al. (11) incubated at 37°C for 3 days under anaerobic conditions, dextrane-producing leuconostocs on Mayeux-Sandine-Ellicker (MSE) agar with 10% saccharose (16) agar incubated at 30°C for 48 h, enterococci on Slanetz-Bartley (SB) agar (28) incubated at 42°C for 48 h, pseudomonads on cefrimide-fucidin-cephalosporin (CFC) agar (17), *Enterobacteriaceae* on violet red-bile-glucose (VRBG) agar (21), and yeasts and molds on oxytetracyclin-glucose agar (OGA) (22). All media were purchased from Biokar Diagnostics (Pantin, France).

Analysis of enterotoxin production in cheese. Cheese samples (25 g) were tested for the presence of enterotoxins (A to E) by using the Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins (ST 0796, Diffchamb, Lyon, France). The tests were performed by the Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières (LIAL)-Massif Central (Aurillac, France) as recommended by the manufacturer. This kit has a detection limit of ca 0.1 ng/g as determined by LIAL. Samples found positive for enterotoxins by the Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins were further analyzed by the Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA, Maisons-Alfort, France) using the SET-RPLA assay (Staphylococcal Enterotoxin Test-Reversed Passive Latex Agglutination; Oxoid, Basingstoke, UK), to determine the type of enterotoxin produced (A to D). Detection limits of this kit were 0.12, 0.07, 0.17, and 0.1 ng/g of cheese for enterotoxins A, B, C, and D, respectively.

Statistical analysis. For each variable measured at the different cheese-making stages and ripening times, standard analyses of variance were performed to assess the effect of the cheese-making technology (SN, mSN, and SA cheeses) using Statistica software (Statsoft, version 6, Maisons-Alfort, France). When the differences were significant, a Newman-Keuls test was performed. Statistical correlations were carried out by the Pearson's correlation coefficient. Considering the correlation ($r > 0.80$) between levels of SC⁺ at 6 h and their initial level in raw milk, the analysis of covariance on repeated measures was performed to assess the

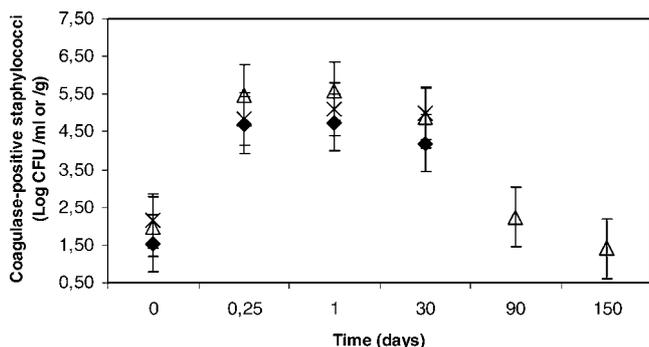


FIGURE 1. Growth of coagulase-positive staphylococci in three types of uncooked, semihard cheeses. Values are the mean of 8 cheese-making batches for farm Saint-Nectaire cheeses (SN, X), 12 batches for model Saint-Nectaire cheeses (mSN, ◆), and 29 batches for Salers cheeses (SA, △).

effect of the cheese-making technology (SN, mSN, SA cheeses). Ripening times (6 h, 24 h, and 30 days) were used as repeated effect. The number of SC⁺ at the initial sampling time in milk (T₀) and pH were used as covariates in the model. When a significant effect was detected, the least-squares means test was performed to compare the adjusted means of time and cheese-making technology. The mixed procedure of SAS 8.01 was used for these analyses. At 6 h and 24 h of ripening time, a stepwise multiple linear regression was performed for each cheese-making technology to assess the parameters which can explain the number of SC⁺.

RESULTS

Changes in coagulase-positive staphylococci counts.

Cheeses were treated as three groups according to the cheese-making technology. A total of 49 cheese-making

batches comprising 8 SN cheeses, 12 mSN cheeses, and 29 SA cheeses were analyzed. Figure 1 and Table 1 show the evolution of SC⁺ counts in the three types of cheeses during cheese making and ripening, as determined on RPF agar. Independent of the cheese type, SC⁺ grew rapidly during the first 6 h (Table 1, delta values), then more slowly up to 24 h, when the population reached a peak. Afterward, population levels either remained stable in SN cheeses or slightly decreased in mSN cheeses over the 30 days of ripening. In SA cheeses, population levels slightly decreased between day 1 and day 30 and markedly decreased further between day 30 and day 150 of ripening. So, the SC⁺ populations were almost at a peak in all 6-h-old cheeses.

Evolution of physicochemical parameters.

The pH of all cheeses decreased sharply over the first 24 h (Table 1). At 6 h, the pH values were similar in SN cheeses (average, 5.56) and in mSN cheeses (average, 5.68), but they were significantly higher in SA cheeses with an average at 6.26 (Table 1 and Fig. 2, y axis values). In 24-h cheeses, pH values ranged between 5.10 and 5.42, independent of the cheese type, with average values of 5.24 and 5.19 in SN and SA cheeses, respectively. Similarly, the dry matter content of the cheeses increased rapidly over the first 24 h (Table 1). As early as the 6th hour, the dry matter contents were significantly higher in SA cheeses, ranging between 48.45 and 57.38% with an average of 52.52%, than in SN cheeses where values ranged between 46.43 and 49.58% with an average of 47.69%.

Changes in microbial counts.

Principal component analysis of bacterial, yeast, and mold counts data (Fig. 3) showed that cheeses at 24 h were clustered according to

TABLE 1. Counts and growth of coagulase-positive staphylococci, pH values, and dry matter content in raw milk and in two different types of uncooked, semihard cheeses at different times of ripening^a

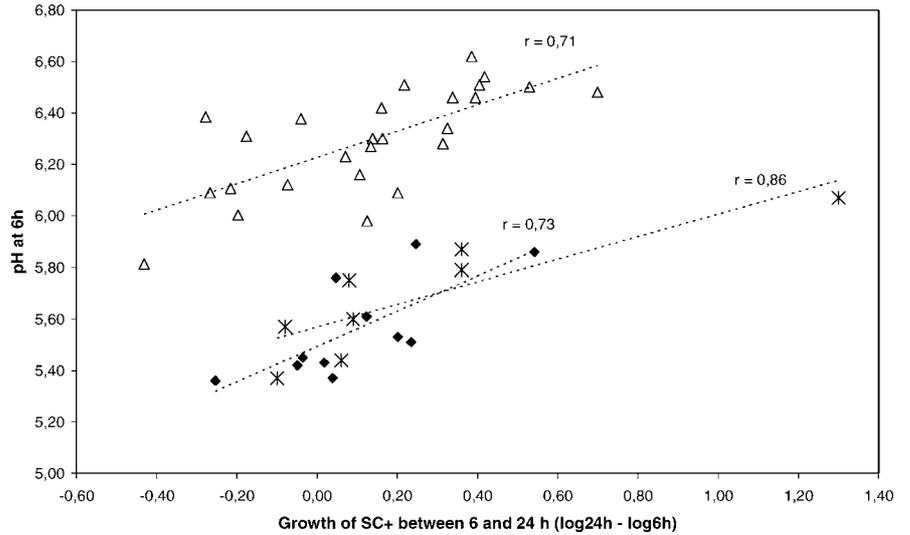
Cheese type	Time, days	Staph (log)			Delta ^b			pH			Dry weight (%)		
		\bar{x}	<i>s</i>	<i>t</i>	\bar{x}	<i>s</i>	<i>t</i>	\bar{x}	<i>s</i>	<i>t</i>	\bar{x}	<i>s</i>	<i>t</i>
mSN	0	1.54	0.78	NS				6.70	0.05	NS	12.25	0.28	B***c
SN	0	2.14	0.56	NS				6.56	0.03	NS	11.91	0.43	AB***
SA	0	1.99	0.77	NS				6.67	0.05	NS	11.62	0.46	A***
mSN	0.25	4.69	0.62	A*	3.05	0.41	B**	5.56	0.18	A***			
SN	0.25	4.84	0.60	A*	2.70	0.30	A**	5.68	0.23	A***	47.69	1.12	A***
SA	0.25	5.49	0.86	B*	3.51	0.39	C**	6.26	0.22	B***	52.52	1.94	B***
mSN	1	4.75	0.64	A*	0.45	1.22	NS	5.20	0.06	A**	51.26	2.47	A**
SN	1	5.10	0.75	AB*	0.26	0.45	NS	5.30	0.07	B**	50.85	1.12	A**
SA	1	5.59	0.87	B*	0.67	1.65	NS	5.19	0.09	A**	54.40	2.16	B**
mSN	30	4.20	1.12	NS	-0.55	0.94	NS	5.12	0.03	A**	51.91	2.15	A***
SN	30	4.99	0.83	NS	-0.11	0.33	NS	5.21	0.09	B**	53.27	2.20	A***
SA	30	4.87	1.11	NS	-0.29	0.59	NS	5.22	0.06	B**	59.55	0.94	B***
SA	90	2.24	1.42		-1.00	3.06		5.34	0.06		59.71	0.75	
SA	150	1.41	0.47		-0.83	1.18		5.37	0.08		60.30	0.92	

^a Values are the mean of 8 cheese-making batches for farm Saint-Nectaire cheeses (SN), 12 batches for model Saint-Nectaire cheeses (mSN), and 29 batches for Salers cheeses (SA). Counts in log CFU per milliliter for milk or log CFU per gram for cheese.

^b Delta at 6 h: log count at 6 h – log count in milk (time 0); at day 1: log count at day 1 – log count at 6 h, etc.

^c At each time, letters A, B, and C in the same column indicate homogeneous statistical processing groups that were significantly different according to the Newman-Keuls statistical test, with A < B < C. *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; NS, not significant.

FIGURE 2. Relationship between growth of coagulase-positive staphylococci over the first 6 h and pH values in cheeses at 6 h. Growth of coagulase-positive staphylococci was expressed as log CFU per gram at 6 h and log CFU per milliliter in milk. Farm Saint-Nectaire cheeses (SN, ✕), model Saint-Nectaire cheeses (mSN, ◆), Salers cheeses (SA, △).



the cheese type. Compared to SN and mSN cheeses, SA cheeses were characterized by high counts of mesophilic bacterial populations (M17 agar at 30°C), FH lactobacilli (FH agar), dextran-producing leuconostocs (MSE⁺), lactococci (TSE agar), and molds (OGA molds). Among the Saint-Nectaire cheeses, SN cheeses were characterized by higher counts in mesophilic bacterial populations (M17 agar at 30°C), enterococci (SB agar), and yeasts (OGA yeasts) compared to mSN cheeses which were characterized by higher counts in *Enterobacteriaceae* (VRBG agar) and pseudomonads (CFC agar).

Effects of parameters affecting levels of SC⁺. Coagulase-positive staphylococci numbers in raw milk ranged from undetectable (<10 CFU/ml) to 3.03 log CFU/ml. Within 6 h, curd counts increased by 2.4 to 4.2 log depending on the batch. The highest increase was observed in SA cheeses with an average value of 3.51 log (Table 1, delta values). Between 6 h and 24 h, counts increased by less than 0.5 log independent of the cheese type, except for

two batches of mSN and SA cheeses, where increases were 0.7 log and 1.3 log, respectively. The maximal levels reached in cheese on day 1 ranged between 2.82 and 6.84 log CFU/g and were the highest in SA cheeses with an average value of 5.59 log CFU/g (Table 1). From day 30 to day 150, in long-ripened SA cheeses, SC⁺ counts decreased markedly and final levels ranged from undetectable (<10 CFU/ml) to 2.30 log CFU/ml.

Table 2 indicates that the level of SC⁺ reached during the first 24 h was greatly influenced by the initial level of SC⁺ in milk, followed by the cheese type. The level of SC⁺ in Salers cheeses and Saint-Nectaire cheeses (SN or mSN) differed most significantly at 6 h, slightly so at 24 h, and no longer differed on day 30.

The stepwise multiple regression analysis (Table 3) selected the initial level of SC⁺ in milk as sole relevant factor to explain the level at 6 h in all cheese types. A strong positive correlation ($r > 0.80$, $n = 49$) between levels of SC⁺ at 6 h and their baseline level in raw milk was ob-

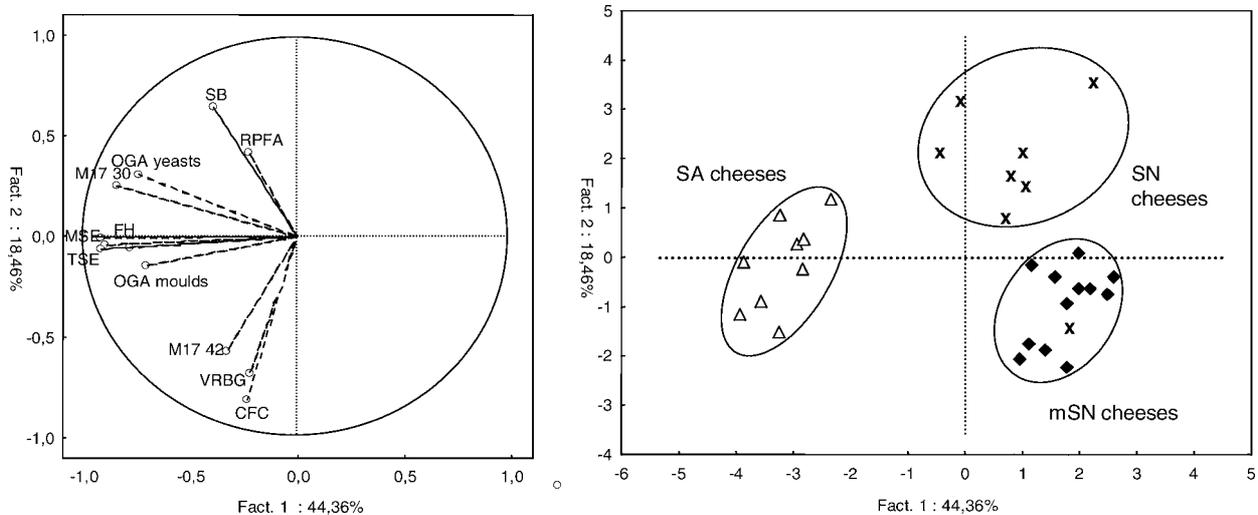


FIGURE 3. Principal component analysis of microbiological counts data cheeses at day 1. (Left) Projection of variables on factorial plan. The variables were the counts on M17, SB, VRBG, FH, CFC, MSE, TSE, OGA, and RPF agar media for cheeses at day 1. (Right) Projection of the samples corresponding to the 8 farm Saint-Nectaire cheeses (SN, ✕), the 12 model Saint-Nectaire cheeses (mSN, ◆), and 9 of the 29 Salers cheeses (SA, △).

TABLE 2. Hierarchy of parameters affecting levels of coagulase-positive staphylococci during the first 24 h according to covariance analysis for repeated measures

Effect	F	P
Staph _{0h} (log CFU per milliliter)	105.26	0.0001***a
Cheese type	9.22	0.0004***
Cheese type × time	3.54	0.0116*
pH × time	3.13	0.0318*

a *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001.

served whatever the cheese type (Table 3). All cheeses exhibiting counts below 5 log CFU/g on day 1 were prepared from milk containing less than 1.61 log CFU/ml (41 CFU/ml), except for one milk batch which contained 2.39 log CFU/ml. The SC⁺ count reached in cheese on day 1 was best explained by the interactive effect of the SC⁺ counts and pH values at 6 h (Table 3). So, strong positive correlations (r > 0.70) between pH values in cheese at 6 h and further SC⁺ growth between 6 and 24 h were observed for all cheese types (Fig. 2). More than 80% of the cheeses for which no significant growth was observed between 6 and 24 h (delta ≤ 0.2 log CFU/g) had reached pH values at 6 h below 5.6 in SN and mSN cheeses or below 6.3 in SA cheeses. The higher threshold pH value associated to the slowing down of SC⁺ growth in SA cheeses suggested that other factors may affect SC⁺ growth in SA cheeses. However, no correlation was found between dry matter content of the cheeses and SC⁺ growth at any time (data not shown). In addition, no significant link was established between SC⁺ growth (during the first 6 h or further to 24 h) and the levels of any microbial group at any time (data not shown).

Enterotoxin production in cheese. All 49 cheeses on day 1 were analyzed using the Transia ELISA kit to check for the presence of staphylococcal enterotoxins. Two samples originating from SA cheeses and three from mSN cheeses gave positive results. Further analysis by AFSSA confirmed the presence of enterotoxins only in the two SA cheeses. SC⁺ counts on day 1 in the first cheese was 5.55 log CFU/g and it was 5.06 log CFU/g in the second cheese. No enterotoxin was detected in the other 33 SN, mSN, and SA cheeses that had SC⁺ counts above 5 log CFU/g and up to 6.84 log CFU/g. In the first cheese, enterotoxin C was detected below the quantification limit at 6 h and estimated at 3.45 ng/g in cheese on day 1. In the second cheese, no enterotoxin was detected up to 6 h but enterotoxin A was detected below the quantification limit in cheese on day 1. The pH at 6 h was 6.62 in the first cheese, the highest among all cheeses tested, and it was 6.50 in the second cheese.

DISCUSSION

Despite major differences in the cheese-making parameters (i.e., addition of starter cultures, pre-pressing, and maturation step), the general behaviour of SC⁺ was similar in the three groups of cheeses. SC⁺ counts dramatically increased from milk to reach their maximal values in 24-

TABLE 3. Parameters explaining the levels of coagulase-positive staphylococci at 6 and 24 h selected through stepwise multiple regression

Variables	Cheese type	Significant parameters	R ²
Staph _{6h}	SN + mSN	Staph _{0h}	0.74
	SA	Staph _{0h}	0.67
Staph _{24h}	SN + mSN	Staph _{6h} + pH _{6h}	0.93
	SA	Staph _{6h} + pH _{6h}	0.92

h-old cheeses. Afterward, they either stabilized or decreased markedly in long-ripened SA cheeses. This result is consistent with other studies where *S. aureus* was found to peak within the first days in Saint-Nectaire cheese (19, 26) and within 24 h in lactic cheese, Camembert-like cheese (20), and Reblochon (19). Although part of this increase was due to a concentration effect resulting from the physical entrapment of cells in the curd, our results show that the critical phase of exponential growth of SC⁺ occurs mainly within the first 6 h. In the three cheese types, the initial level of SC⁺ in milk had the strongest influence on the level reached in 24-h-old cheese, but the pH values in cheese at 6 h also contributed significantly to this level. This result was in agreement with those of Lindqvist et al. (15) which showed that the level of *S. aureus* in unripened cheeses at the time of consumption was a function of the initial level in raw milk. The SC⁺ levels found in cows' raw milk in this study were highly variable but still ranged below the levels most frequently applied in milk inoculation experiments inoculation between 10⁴ and 10⁶ CFU/ml (1, 5, 18). Meyrand et al. (18, 20) studied the development of SC⁺ in raw milk Camembert cheese with slow acidification kinetics. When starting from 4 log CFU/ml, SC⁺ reached 6.9 log after 6 h and 7.48 log after 22 h. When plotted with the data obtained from our results, data from Meyrand et al. (18, 20) at 0 and 6 h closely fitted the linear regression line. However, starting from a higher inoculum (above 5 log CFU/ml), slow growth was observed and the data did not fit in our results anymore (1, 18, 20).

SC⁺ growth was only affected after 6 h of cheese making. The positive correlation found between pH at 6 h and growth of SC⁺ between 6 and 24 h suggested that, in the varieties of cheeses studied with relatively slow acidification kinetics during the first 6 h, the pH did not have any effect on the initial growth phase of *S. aureus* before 6 h but may have had a modulating effect on subsequent growth up to 24 h. These results were in agreement with those of Lamprell (13) who indicated 6 h was the critical time for pH values for the semihard cheeses Cantal and Tomme de Savoie. Dry matter content and microbial counts in cheeses did not seem to influence the slowing down of SC⁺ associated with different pH values in the two cheese varieties. Nevertheless, microbial antagonistic effects on SC⁺ may lie in the diversity of species or strains found on the different culture media rather than in the total population counted on these media.

In the present work, despite the fact that a large frac-

tion of the cheeses contained levels of *S. aureus* above the *M*-value (5 log CFU/g), SEs were rarely detected. In fact, no simple relationship has been established yet between the bacterial count and the toxin concentration (15). In Saint-Nectaire cheese, after addition of an enterotoxigenic strain at 10⁴ to 10⁵ CFU/g in raw milk, no production of SE was observed until *S. aureus* levels exceeded 10⁷ CFU/g (20, 26). In Manchego cheese, in spite of *S. aureus* populations above 7 log, no production of enterotoxin was detected (5, 23). In this study, *S. aureus* populations never reached 7 log CFU/g, but in the two cases where SE production occurred, not only did they exceed 5 log but pH values of the cheeses at 6 h also exceeded 6.3. The production of enterotoxins is optimal in neutral pH and is usually inhibited at pH values below 5 (14). Three samples from mSN cheeses that gave positive results using the Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins were not confirmed positive by AFSSA using the SET-RPLA assay. False-positive results were noted when using the Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins by Vernozy-Rozand et al. (33) when testing some meats and seafood products and by Lamprell (13) in semihard cheeses.

Staphylococcal enterotoxic (SE) C was produced in larger quantities than SEA and was detected as early as the 6th hour, suggesting it was formed during the exponential growth of the bacteria, while SEA started to be produced between the 6th and the 24th h only. In the surveys by Stephan et al. (29) and Villard et al. (34), SEC-producing strains were most frequently isolated from cows' milk, followed by SED and SEA. However, SEA and SED would be the most frequently isolated from cheeses implicated in food poisoning (5, 10, 33).

In conclusion, these results provide useful information for the control of *S. aureus* in uncooked, semihard cheeses. They show that the first 6 h of cheese making are critical for SC⁺ development and that any tool to inhibit growth of *S. aureus* must be effective within this time interval. The initial level of SC⁺ in raw milk should be maintained below 100 CFU/ml and best below 40 CFU/ml. Moreover, managing the cheese-making process to obtain pH values within the range acceptable for each cheese type, around or below 5.8 at 6 h in Saint-Nectaire cheeses and around or below 6.3 at 6 h in Salers cheeses, would limit growth and may help controlling enterotoxin production. Inhibitory starters may also be used. Bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* were found to reduce levels of *S. aureus* in cheese during ripening (1, 25). However, until now, bacteriocin-producing strains have been of little help to inhibit growth of *S. aureus* in cheese between 0 and 24 h (9), except in an acid-coagulated cheese (24).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to DATAR-Massif Central for financial support. They also sincerely thank the Pole Fromager AOC Massif Central, CIF (Comité Interprofessionnel des Fromages), LIAL Massif Central (Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières), Saint-Nectaire cheese trade, and the farmers for their collaboration. They are grateful to Béatrice Desserre, Robert Didienne, and René Lavigne for technical assistance and sample collection and to Philip Rousseau-Cunningham for help with the English text.

REFERENCES

- Arques, J. L., E. Rodriguez, P. Gaya, M. Medina, B. Guamis, and M. Nunez. 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98:254–260.
- De Buyser, M. L., B. Dufour, M. Maire, and V. Lafarge. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 1–17.
- De Buyser, M. L., B. Lombard, S. M. Schulten., P. H. In't Veld, S. L. Scotter, P. Rollier, and C. Lahellec. 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999—enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 83:185–194.
- Gaya, P., M. Medina, L. Bautista, and M. Nunez. 1988. Influence of lactic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behaviour in Manchego cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 6:249–257.
- Gomez-Lucia, E., J. Goyache, J. A. Orden, A. Domenech, F. Javier Hernandez, J. A. Ruiz-Santa Quiteria, B. Lopez, J. L. Blanco, and G. Suarez. 1992. Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J. Dairy Sci.* 75:19–26.
- Haeghebaert, S., F. Le Querrec, A. Gally, P. Bouvet, M. Gomez, and V. Vaillant. 2002. Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bull. Epidémiol. Hebdo.* 23:105–109.
- Haines, W. C., and L. G. Harmon. 1973. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Appl. Microbiol.* 25:436–441.
- Haines, W. C., and L. G. Harmon. 1973. Effect of variations in conditions of incubation upon inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Pediococcus cerevisiae* and *Streptococcus lactis*. *Appl. Microbiol.* 25:169–172.
- Hamama, A., N. El Hankouri, and M. El Ayadi. 2002. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *Int. Dairy J.* 12:933–938.
- Ikedo, T., N. Tamate, K. Yamaguchi, and S. Makino. 2005. Mass outbreak of food poisoning disease caused by small amounts of staphylococcal enterotoxins A and H. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2793–2795.
- Isolini, D., M. Grand, and H. Glättli. 1990. Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. *Schweiz. Milchwirtsch. Forsch.* 19:57–59.
- Jorgensen, H. J., T. Mork, H. R. Hogasen, and L. M. Rorvik. 2005. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. *J. Appl. Microbiol.* 99:158–166.
- Lamprell, H. 2003. La production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Ph.D. dissertation. University of Bourgogne, France.
- Le Loir, Y., F. Baron, and M. Gautier. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gen. Molec. Res.* 2:63–76.
- Lindqvist, R., S. Sylven, and I. Vagsholm. 2002. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in un-ripened cheese made from raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 78:155–170.
- Mayeux, J. V., W. E. Sandine, and P. R. Elliker. 1962. A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *J. Dairy Sci.* 45:655.
- Mead, G. C., and B. W. Adams. 1977. A selective medium for the rapid isolation of pseudomonads associated with poultry meat spoilage. *Br. Poult. Sci.* 18:661–670.
- Meyrand, A., S. Boutrand-Loei, S. Ray-Gueniot, C. Mazuy, C. E. Gaspard, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre, and C. Vernozy-Rozand. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *J. Appl. Microbiol.* 85:537–544.
- Meyrand, A., and C. Vernozy-Rozand. 1999. Croissance et entéro-

- toxinogénèse de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Rev. Méd. Vét.* 150:1–16.
20. Meyrand, A., C. Vernozy-Rozand, A. Gonthier, C. Mazuy, S. Ray-Gueniot, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre, and Y. Richard. 1999. Main differences in behavior and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in two different raw milk cheeses. *Rev. Méd. Vét.* 150:271–278.
 21. Mossel, D. A. A., M. Visser, and A. M. R. Cornelissen. 1963. The examination of foods for *Enterobacteriaceae* using a test of the type generally adopted for the detection of *Salmonellae*. *J. Appl. Bacteriol.* 24:444–452.
 22. Mossel, D. A. A., M. Visser, and W. H. J. Mengerink. 1962. A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in food and beverages. *Lab. Pract.* 11:109–112.
 23. Otero, A., M. C. Garcia, M. L. Garcia, J. A. Santos, and B. Moreno. 1993. Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains FRI 137 and FRI 361 during the manufacture and ripening of manchego cheese. *Int. Dairy J.* 3:85–96.
 24. Rilla, N., B. Martinez, and A. Rodriguez. 2004. Inhibition of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z-producing strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 729. *J. Food Prot.* 67:928–933.
 25. Rodriguez, E., J. Calzada, J. L. Arques, J. M. Rodriguez, M. Nunez, and M. Medina. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int. Dairy J.* 15:51–57.
 26. Sesques, M. 1994. Staphylocoques à coagulase positive dans le fromage fermier au lait cru de Saint Nectaire. Ph.D. dissertation. University Claude Bernard-Lyon I, France.
 27. Simeao do Carmo, L., R. S. Dias, V. R. Linardi, M. Jose de Sena, D. Aparecida dos Santos, M. Eduardo de Faria, E. C. Pena, M. Jett, and L. G. Heneine. 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol.* 19:9–14.
 28. Slanetz, L. C. W., and C. H. Bartley. 1957. Numbers of enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *J. Bacteriol.* 74:591–596.
 29. Stephan, R., C. Annemuller, A. A. Hassan, and C. Lammler. 2001. Characterization of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* 78:373–382.
 30. Sutherland, J. P., A. J. Bayliss, and T. A. Roberts. 1994. Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int. J. Food Microbiol.* 21:217–236.
 31. Terzaghi, B. E., and W. E. Sandine. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 29:807–813.
 32. Turner, N., W. E. Sandine, P. R. Elliker, and E. Day. A. 1963. Use of tetrazolium dyes in an agar medium for differentiation of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *J. Dairy Sci.* 46:380–385.
 33. Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy-Cruchaudet, C. Bavai, and Y. Richard. 2004. Comparison of three immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. *Lett. Appl. Microbiol.* 39:490–494.
 34. Villard, L., H. Lamprell, E. Borges, F. Maurin, Y. Noel, E. Beuvier, J. F. Chamba, and A. Kodjo. 2005. Enterotoxin D producing strains of *Staphylococcus aureus* are typeable by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Food Microbiol.* 22:261–265.

Tableau 19: Différence de numération (delta) (LogN (lait traité)- LogN (lait non traité)) de *Staphylococcus* coagulase positive entre des laits traités 4 minutes au Stomacher ou non traités. Les laits ont été incubés pendant 3, 6 et 24 h comme décrit dans le paragraphe 3.2.5 de matériel et méthodes.

	Temps d'incubation			
	0 h	3 h	6 h	24 h
Delta	0,09±0,09	1,04±0,48	1,08±0,56	0,66±0,47

Les deltas sont la moyenne de l'analyse des différentes de numérations de 11 laits AOC Salers broyés et non broyés. Leur origine est précisée dans le paragraphe 3.2.3.2.

Tableau 20: Croissance de *S. aureus* (a) souche SA15 en lait pasteurisé, lait pasteurisé caillé et fromage au lait pasteurisé. (b) souches naturellement présentes en lait AOC Salers, lait AOC Salers caillé et fromage au lait AOC Salers.

(a)	Croissance de <i>S. aureus</i> SA15 et pH de milieu à					
	3 h		6 h		24 h	
	Delta (Δ)	pH	Delta (Δ)	pH	Delta (Δ)	pH
Lait pasteurisé	0,59±0,07 ^{NS}	6,27±0,16 ^{NS}	0,60±0,05 ^{NS}	5,30±0,17 ^{NS}	0,43±0,04 ^{NS}	4,51±0,16 ^{b*}
Lait pasteurisé caillé	0,54±0,13 ^{NS}	6,26±0,16 ^{NS}	0,66±0,09 ^{NS}	5,38±0,15 ^{NS}	0,54±0,12 ^{NS}	4,64±0,19 ^{b*}
Fromage au lait pasteurisé	0,48±0,14 ^{NS}	6,22±0,13 ^{NS}	0,64±0,18 ^{NS}	5,51±0,12 ^{NS}	0,65±0,31 ^{NS}	5,24±0,14 ^{a*}

(b)	Croissance des <i>Staphylococcus</i> coagulase positive et pH de milieu à					
	3 h		6 h		24 h	
	Delta (Δ)	pH	Delta (Δ)	pH	Delta (Δ)	pH
Lait AOC Salers	1,21±0,33 ^{NS}	6,37±0,17 ^{NS}	1,53±0,47 ^{NS}	5,65±0,40 ^{NS}	1,55±0,39 ^{NS}	4,67±0,21 ^{b*}
Lait AOC Salers caillé	1,47±0,20 ^{NS}	6,31±0,19 ^{NS}	1,72±0,32 ^{NS}	5,44±0,35 ^{NS}	1,67±0,56 ^{NS}	4,54±0,10 ^{b*}
Fromage au lait AOC Salers	1,01±0,20 ^{NS}	6,29±0,18 ^{NS}	1,16±0,35 ^{NS}	5,45±0,14 ^{NS}	1,20±0,28 ^{NS}	5,31±0,10 ^{a*}

Les résultats en lait pasteurisé sont la moyenne de 3 essais avec 3 laits différents. Les résultats en lait AOC Salers sont la moyenne de 4 essais avec 4 laits différents. Pour tenir compte de la concentration d'un facteur 10 dans les fromages, les niveaux des SC+ dans le lait de fabrication de fromage ont été multipliés par 10. Pour chaque milieu (lait, lait emprésuré et fromage); Δ à 3 h = LogN3 – LogN0; Δ à 6 h = LogN6 – LogN0; Δ à 24 h = LogN24 – LogN0. N3, 6 et 24 h = niveaux de *S. aureus* à 3, 6 et 24 h.

NS= non significatif, * = p< 0,05. Dans la même colonne, les lettres a et b indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a>b). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls.

Les laits, laits emprésurés et les fromages ont été préparés comme décrit dans les paragraphes 3.2.4.2 et 3.2.6.

Travaux complémentaires

1. Effet du broyage du lait sur la numération des *Staphylococcus coagulase positive*

Afin de vérifier si la numération des SC+ dans le lait n'était pas sous estimée, nous avons évalué un effet du traitement du lait pendant 4 minutes comme pratiqué dans le fromage, sur les niveaux de SC+. Le broyage pourrait dissocier les amas bactériens et augmenter le nombre de cellules pouvant donner des colonies.

Dans ce but, nous avons comparé les numérations des SC+ dans différents laits incubés dans les conditions de fabrication de Saint-Nectaire. Les résultats présentés dans le tableau 19 montrent que les deltas des numérations de SC+ sont faibles dans le lait que celui soit traité 4 minutes au Stomacher ou non traité. En revanche, dès qu'il y a multiplication cellulaire dans le lait, les niveaux de SC+ sont plus importants dans le lait broyé que dans le lait non broyé avec un delta de 1,04 log à 3 h, de 1,08 log à 6 h et de 0,66 à 24 h. Par conséquent, dans la suite des expérimentations les laits ont été systématiquement broyés pendant 4 minutes avant dénombrement.

Ces résultats permettent de conclure que la forte augmentation des niveaux de SC+ dans les fromages entre 0 et 6 h ne serait pas due à une sous estimation de niveau de SC+ dans le lait dû à une absence de broyage.

2. Comparaison de la croissance de *S. aureus* SA15 et des SC+ dans le lait, lait caillé et fromage

La croissance de *S. aureus* SA15 en lait pasteurisé, lait pasteurisé caillé et fromages au lait pasteurisé a été comparée en mesurant la différence d'accroissement de population à 3, 6 et 24 h. Cette comparaison a également été faite avec des laits crus d'AOC Salers. Les points de cinétique analysés ont été choisis sur la base d'évolution de *S. aureus* dans les fromages.

Les résultats présentés dans le tableau 20 montrent que quel que soit le lait (lait pasteurisé ou lait cru), la population de *S. aureus* SA15 ou des SC+ croît de façon identique dans le lait, le lait caillé et le fromage. L'augmentation de population de *S. aureus* SA15 ou des SC+ est significativement identique entre le lait, le lait caillé et le fromage. Il est surprenant de noter que la forte diminution du pH dans le lait (pH 4,5)

Tableau 21: Effet du milieu de préculture sur la croissance (delta) de *S. aureus* SA15 en culture seule en lait microfiltré (Marguerite).

Delta (Δ)	Milieux de préculture						Lait reconstitué
	BHI	BHI modifié avec (g/l) de lait reconstitué				60	
		1,2	3,6	6,0	12		
3 h	0,75±0,35 ^{NS}	0,84±0,41 ^{NS}	0,69±0,16 ^{NS}	1,09±0,20 ^{NS}	1,02±0,14 ^{NS}	1,08±0,04 ^{NS}	0,69±0,16 ^{NS}
6 h	1,53±0,19 ^{NS}	1,95±0,22 ^{NS}	1,97±0,35 ^{NS}	2,08±0,08 ^{NS}	2,13±0,04 ^{NS}	2,20±0,16 ^{NS}	1,74±0,45 ^{NS}
24 h	4,76±0,07 ^{NS}	4,82±0,21 ^{NS}	4,87±0,04 ^{NS}	5,13±0,05 ^{NS}	5,09±0,04 ^{NS}	5,01±0,24 ^{NS}	4,74±0,21 ^{NS}

Les résultats sont la moyenne de 2 essais. Δ à 3 h = LogN3 – LogN0; Δ à 6 h = LogN6 – LogN0; Δ à 24 h = LogN24 – LogN0. N3, 6 et 24 h= niveaux de *S. aureus* SA15 en lait microfiltré(Marguerite) à 3, 6 et 24 h.

NS= non significatif.

et le lait emprésuré (pH 4,64) par rapport aux fromages (5,24) ne limite pas la croissance de SC+ qui est identique à celle notée dans le fromage.

Ces résultats nous permettent de conclure que la présure n'avait pas d'effet sur la croissance de *S. aureus* SA15 ou des SC+.

L'accroissement des populations des SC+ naturellement présentés dans le lait cru ou dans les fromages correspondant est supérieur à celui noté pour la souche *S. aureus* SA15 dans le lait pasteurisé.

3. Conditions de préculture des souches

La différence entre l'accroissement des SC+ naturellement présents dans le lait AOC Salers et celui de *S. aureus* SA15 dans le lait pasteurisé pourrait être attribuée soit aux conditions de préculture de la souche *S. aureus* SA15, soit aux caractéristiques de la souche, soit au traitement thermique du lait. Cette souche avait été précultivée en milieu BHI, elle ne serait donc pas préadaptée au milieu lait. Afin d'essayer de favoriser la croissance de *S. aureus* SA15 en milieu lait, nous avons testé différentes conditions de préculture comme indiquée dans le tableau 21. La préculture de la souche *S. aureus* SA15 dans un milieu BHI enrichi en lait reconstitué entre 6 et 12 g/l permet une croissance plus rapide et plus importante que le milieu BHI non supplémenté ou que le milieu lait. Les différences ne sont cependant pas significatives. La moindre croissance en lait ne semblerait pas due aux conditions de préculture de la souche. Plusieurs études indiquent que les conditions de préculture affectent plutôt le temps de latence que le niveau maximal atteint.

La nature du lait ou les caractéristiques physiologiques des souches de *S. aureus* seraient donc plutôt responsables de ces différences.

Dans toutes les expérimentations ultérieures, *S. aureus* SA15 a été précultivée dans un milieu BHI modifié avec 12 g/l de lait reconstitué.

CHAPITRE 2

Effet des souches de *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* et *Enterococcus faecalis* sur le comportement de *Staphylococcus aureus*

Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk.

Alomar J., Loubiere P., Delbes C., Nouaille S. and Montel, M.C.

Food Microbiology 2007. (En révision)

Chapitre 2: Effet des souches de *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* et *Enterococcus faecalis* sur le comportement de *Staphylococcus aureus*

2.1. Objectif

L'objectif de cette partie était de cerner la nature des interactions entre *S. aureus* et différentes souches de *Lactococcus* et *Enterococcus* en lait microfiltré.

2.2. Méthodologie

Les protocoles correspondant à cette partie sont présentés dans les paragraphes (3.1 à 3.8) du matériel et méthodes. La souche *S. aureus* SA15 a été sélectionnée parmi des souches de *S. aureus* testées dans une étude antérieure (Rapport R97/22). Elle était la moins inhibée par les bactéries lactiques testées. Elle est capable de produire des entérotoxines en milieu lait et en milieu BHI (la production des entérotoxines dans ce milieu a été vérifiée).

Le lait entier microfiltré (lait épuré en microorganismes) (Marguerite, Villefranche sur Saône, ARNAS, France) a été choisi sur la base de la faible contamination microbienne de ce lait et de la croissance importante de *S. aureus* SA15 dans ce lait (cf. Tableau 21).

2.3. Résultats

Les résultats ont été synthétisés dans l'article: Alomar J., Loubiere P., Delbes C., Nouaille S., Montel, M.C. (2007) " *Effect of Lactococcus garvieae, Lactococcus lactis and Enterococcus faecalis on the behaviour of Staphylococcus aureus in microfiltered milk*". Cet article est en cours de révision pour *Food Microbiology*.

De cette étude, il ressort que:

- quatre souches de *Lactococcus garvieae*, 3 souches de *Lactococcus lactis* et une souche d'*Enterococcus faecalis* sont capables d'inhiber la croissance de la souche de *S. aureus* SA15 dès 6 h de culture,
- *L. lactis* et *E. faecalis* inhiberaient la croissance de *S. aureus* par abaissement du pH. En revanche, le pH ne serait pas responsable de l'inhibition par *L. garvieae* car, en cours d'incubation, il reste supérieur à 6,2 sans production d'acide lactique (< 1g/l) et d'acétate. De plus, la souche de *S. aureus* est aussi inhibée par *L. garvieae* dans un milieu tamponné à pH 6,8. Le pH ne serait pas

le seul responsable de l'inhibition de *S. aureus* par *L. lactis* car une inhibition est aussi observée à pH 6,8.

- aucune substance antimicrobienne n'a été mise en évidence dans les surnageants concentrés d'une co-culture de 6 et 24 h en milieu TS tamponné,
- les concentrations en acides aminés ne sont pas des facteurs limitant la croissance de *S. aureus* en co-culture avec *L. lactis*, car la plupart d'entre eux sont produits en cours de co-culture. Dans les milieux contenant *S. aureus* seul, ou dans ceux avec *S. aureus* et *L. garvieae*, la méthionine et la thréonine ne sont plus détectables dans les milieux dès 6 heures d'incubation. L'isoleucine, la valine et la phénylalanine sont en grande partie consommées entre 6 et 24 h d'incubation dans la co-culture de *S. aureus* avec *L. garvieae*. L'ajout de méthionine, thréonine, phénylalanine, isoleucine et valine à une concentration de 10 µmol/l ne lève pas l'inhibition par *L. garvieae*. L'hypothèse d'une compétition nutritionnelle pour les acides aminés n'a donc pas été retenue.

A ce stade de l'étude, il nous semblait intéressant de focaliser nos travaux sur l'interaction *S. aureus* - *L. garvieae*. La souche *L. garvieae* N201, la plus inhibitrice et la moins acidifiante a été choisie. *L. garvieae* a été préféré à *L. lactis* comme modèle d'étude, car les propriétés acidifiantes de *L. lactis* risquaient de compliquer la mise en place des expérimentations (culture en milieu tamponné).

- Dans un premier temps, nous avons étudié quel pouvait être l'effet de la température et du pH sur l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*. Cette étude sera présentée dans le chapitre 3.

- Dans un deuxième temps, sur la base des résultats de ce chapitre et de ceux de la littérature, nous avons cherché à valider l'hypothèse de l'inhibition de *S. aureus* par les *Lactococcus* par production de peroxyde d'hydrogène. Ces travaux seront présentés dans le chapitre 4.

Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk

J. ALOMAR¹, P. LOUBIERE², C. DELBES¹, S. NOUAILLE² AND M. C. MONTEL.^{1*}

¹INRA, Unité Recherches fromagères, 36, rue de Salers, 15000 Aurillac, France

²Laboratoire Biotechnologie - Bioprocédés, INSA, UMR CNRS 5504, UMR INRA 792,135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 4, France

Running head: Inhibition *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus* and *Enterococcus* in milk

Author for correspondence. M.-C. MONTEL, ¹INRA URF 545, Unité Recherches Fromagères, 36, rue de Salers, F-15000 Aurillac, France

E-mail: cmontel@clermont.inra.fr

- Tel: 33 (0) 4 71 45 64 11; Fax: 33 (0) 4 71 45 64 13

Abstract

The effect of four strains of *Lactococcus garvieae*, three strains of *Lactococcus lactis* and one strain of *Enterococcus faecalis* on *S. aureus* SA15 growth in microfiltered milk was evaluated. *Lactococcus* and *Enterococcus* strains were co-cultured with *S. aureus* in microfiltered milk and in medium buffered at pH 6.8. All *Lactococcus* and *Enterococcus* strains were able to inhibit *S. aureus* growth after six hours of incubation. Inhibition by *L. lactis* and *E. faecalis* strains could be attributed to the decrease in pH below 6.0. *L. garvieae* strains were the most effective to inhibit *S. aureus* growth without acidification. Thus inhibition of *S. aureus* could not be attributed neither to pH values as it has been observed in medium buffered at pH 6.8, nor to production of lactate, acetate or antistaphylococcal substance. Amino acids competition was not involved in the inhibition by *L. garvieae* as addition of valine, isoleucine, threonine, methionine and phenylalanine did not suppress the inhibition of *S. aureus*. The production of hydrogen peroxide was involved in the inhibition of *S. aureus* by *L. garvieae* and some strains of *L. lactis*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, milk, inhibition

1. Introduction

Safety of raw milk cheeses implies that the development of food borne pathogens be controlled, in compliance with European regulations. *Staphylococcus aureus* can be involved in *Toxi-Infections Alimentaires Collectives* (TIACs) involving milk and dairy products (De Buyser et al. 2001). In 2006, the European legislation laid down the obligation to determine the presence of enterotoxins in cheese if the level of *S. aureus* is over 10^5 CFU g⁻¹. Bacterial contamination of milk has been largely reduced by identifying the potential sources of *S. aureus*, leading to controlling mastitis in herds and applying hygienic practices (Sommerhauser et al. 2003; Chassagne et al. 2005). Nevertheless, the presence of bacterial species in milk cannot be avoided.

In spite of a low count in milk, its count during the first hours of cheesemaking may exceed that authorized by the legislation (Sesques 1994; Meyrand et al. 1998; Lamprell 2003). Therefore, *S. aureus* must be inhibited at a very early stage of the cheesemaking process. *S. aureus* can be inhibited by strong acidification in cheese as its growth can stop in six hours in non cooked semi hard cheeses with a pH value below 5.6 (Delbes et al. 2006). However, strong acidification may limit the development of other bacterial populations involved in the development of the sensorial properties of certain raw milk cheeses (Feeney et al. 2002; Callon et al. 2005).

S. aureus inhibition in culture media could also be achieved through bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* (Stecchini et al. 1991; Todorov et al. 1999; Hernandez et al. 2005) and *Lactobacillus delbrueckii* (Miteva et al. 1998). Nevertheless, the effectiveness of these bacteriocins in

cheese is not well documented, even if inhibition by nisin produced by *Lactococcus lactis*, or enterocin produced by *Enterococcus faecalis* has been observed (Zottola et al. 1994; Hamama et al. 2002; Giraffa 2003). The combination of high pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria inhibited *S. aureus* growth in cheese (Arques et al. 2004). Such treatments may be difficult to apply in some cheese technologies, particularly for farm cheese production.

In purpose to use biopreservation for inhibiting *S. aureus* growth in raw-milk farm production, it is important to select starter cultures. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of different strains of Lactic Acid Bacteria (LAB) belonging to *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* and *Lactococcus garvieae* on *S. aureus* growth in microfiltered milk. All these species were commonly found in raw milk cheeses (Callon et al. 2004) and their antistaphylococcal activities have been reported in the literature.

2. Material and methods

2.1. Bacterial Strains and culture conditions

2.1.1. Bacterial Strains

One strain of *S. aureus* SA15 isolated from raw milk was selected for this study. Four strains of *L. garvieae* (N201, Tan 1, Tan 2, and 1204), three of *L. lactis* subsp. *lactis* (N650, N658 and N688), and one strain of *E. faecalis* (N516) isolated from raw milk cheeses were selected to tested in co-cultured with *S. aureus* in microfiltered milk. The strains of LAB were identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing as described by Callon et al, (2004) and their genomic diversity was assessed by REP-PCR (Jersek et al. 1999).

2.1.2. Inoculum preparation

2.1.2.1. Preparation of *S. aureus* inoculum

For the co-culture in microfiltered milk, *S. aureus* was pre-cultured in BHI (Biokar diagnostic, Pantin, France) broth modified by adding 12 g l⁻¹ of skimmed milk powder (Lactalis industry, Bourgbarré, France) to pre-adapt the strain to its future incubation in milk. For the co-culture in TS buffered medium, *S. aureus* was pre-cultured in BHI (Biokar diagnostic, Pantin, France). The cultures were incubated at 37°C during 18 h. Then the cultures were centrifuged to 9600 x g for 15 min at 4°C (SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France) et the cell pellet was washed once in Ringer solution (Biokar diagnostic, Pantin, France) before inoculation into commercial microfiltered milk or TS buffered medium at level 150 CFU ml⁻¹.

2.1.2.2. Preparation of LAB inoculum

For the co-culture of LAB and *S. aureus* in microfiltered milk, each strain was pre-cultured from a frozen cell suspension in 9 ml of skimmed milk (120 g of skimmed milk powder (Lactalis industry) were prepared in one litre of distilled water and sterilised at 115°C for 15 min); after 18 h of incubation at 30°C, one ml of the culture containing 1 x 10¹⁰ CFU ml⁻¹ was inoculated into 100 ml of raw microfiltered milk (Marguerite) previously inoculated with *S. aureus* as described above.

For the co-culture in TS buffered medium, *L. garvieae* N201, *L. lactis* N658 and *E. faecalis* N516 were pre-cultured in 9 ml of M17 broth for 18 h at 30°C. Then the cultures were centrifuged to 9600 x g for 15 min at 4°C (Sigma

3MK). The cell pellet was washed once in Ringer solution (Biokar) before inoculation at final concentration of 1×10^8 CFU ml⁻¹ into TS buffered medium.

2.1.3. Culture media

S. aureus alone was cultivated in commercial microfiltered milk (Marguerite, Villefranche sur Saône, ARNAS, France) at different initial pH values at 33°C for 24 h. Milk was adjusted to pH 6.50, 6.25, 6.00, 5.78 and 5.60 with 90% lactic acid (Prolabo, Lyon, France), prior to inoculation.

The effect of the eight strains of LAB on *S. aureus* growth was tested in commercial microfiltered milk (Marguerite, Villefranche sur Saône, ARNAS, France). The effect of addition of 10 µmol l⁻¹ of methionine, threonine, phenylalanine, isoleucine and valine (MERCK, Darmstadt, Germany) on *S. aureus* growth in co-culture with *L. garvieae* N201 was studied in microfiltered milk (Marguerite, Villefranche sur Saône, ARNAS, France). These amino acids were selected as they were metabolised by *L. garvieae* N201 (see results table 2). They were prepared in distilled water and sterilized by filtration through a 0.45 µm-pore-size cellulose acetate filter (Minisart, Sartorius AG, Germany).

S. aureus was also co-cultivated with *L. garvieae* N201, *L. lactis* N658 or *E. faecalis* in TS medium containing 17 g l⁻¹ tryptone (Biokar diagnostic, Pantin, France), 3 g l⁻¹ peptone (Biokar diagnostic, Pantin, France), 6 g l⁻¹ yeast extract (Biokar diagnostic, Pantin, France), 2.5 g l⁻¹ K₂HPO₄ (MERCK, Darmstadt, Germany), 5 g l⁻¹ NaCl (Prolabo, Lyon, France). It was buffered at pH 6.8 with phosphate buffer KH₂PO₄/K₂HPO₄ 0.1 mol (KH₂PO₄, Prolabo;

K₂HPO₄, Merck) to avoid the effect of decreasing the pH value of the medium on the growth of *S. aureus*.

2.1.4. Conditions of incubation

The milk inoculated with *S. aureus* alone as well as all co-cultures in microfiltered milk and buffered medium were incubated in water baths at temperatures simulating the decrease in temperature recorded during the cheese making process of some semi hard cheeses such as Saint-Nectaire cheese. The evolution of temperature during the incubation was automatically driven and recorded by the software of CINAC system (YSEBAERT, Frepillon-France). At 0 h the temperature was 33°C, and then gradually decreased to 30.5 at 3 h; 27.3 at 6 h, 24.6 at 9 h, 22.9 at 12 h, 21.0 at 18 h and to 19°C after 24 h of incubation. pH values were recorded with CINAC (YSEBAERT). All the experiments were repeated three times for each strain of lactic acid bacteria (LAB).

2.2. Staphylococcus aureus and lactic acid bacteria counts

Staphylococcus aureus and LAB strains were counted at 0, 3, 6 and 24 h. Milk and TS-buffered medium samples were homogenized with a stomacher Lab Blender (Seward Medical, London, UK) for a time optimised at 4 min for dissociating all the cell aggregates. After appropriate dilution in Ringer solution, *S. aureus* was enumerated on Rabbit Plasma Fibrinogen Agar (RPFA) (De Buyser et al. 2003) incubated for 24 h at 37°C. LAB were enumerated on M17 medium (Biokar diagnostic, Pantin, France) incubated for 48 h at 30°C.

2.3. Chemical analyses

Samples of microfiltered milk and TS buffered medium inoculated with *S. aureus* alone or in co-culture with *L. lactis* N658, *E. faecalis* N516 or *L. garvieae* N201 were analyzed for lactic acid, acetic acid content. The content of amino acid was analysed in cultures in microfiltered milk.

2.3.1. Lactic and acetic acid contents

L-lactate, D-lactate and acetic acid contents were determined using the spectrometric method as recommended in the Kits EnzyPlus of Diffchamb (Kits EnzyPlus Diffchamb, SARL, Lyon- France). Results were expressed in g l⁻¹ of microfiltered milk.

2.3.2. Amino acid analyses

Proteins in the samples of the microfiltered milk were precipitated by adding four volumes of methanol to one volume of samples followed by overnight incubation on ice. Then the mixture was centrifuged and the supernatant was kept for amino acid analyses. Free amino acids in the medium were measured by HPLC (HP 1090, Hewlett Packard, Waldbronn, Germany). The amino acids were automatically derived with OrthoPhtalic Aldehyd (OPA) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and 9-fluorenylmethyl-chloroformiate (FMOC-C1) (Sigma Aldrich). The metabolites were separated on column Hypersil C18 (Thermo Hypersil, Cheshire, Uk) at 35°C by a linear gradient of acetate buffer (pH 7.2)-EDTA-triethyl aminetetrahydrofuranne and gradient of acetate buffer (pH 7.2)-methanol-acetonitrile.

Two detectors were used in parallel; the first one was a diode bar spectrophotometer at 338 nm for OPA derivatives and 262 nm for FMOC derivatives.

2.4. Antistaphylococcal properties of the supernatant

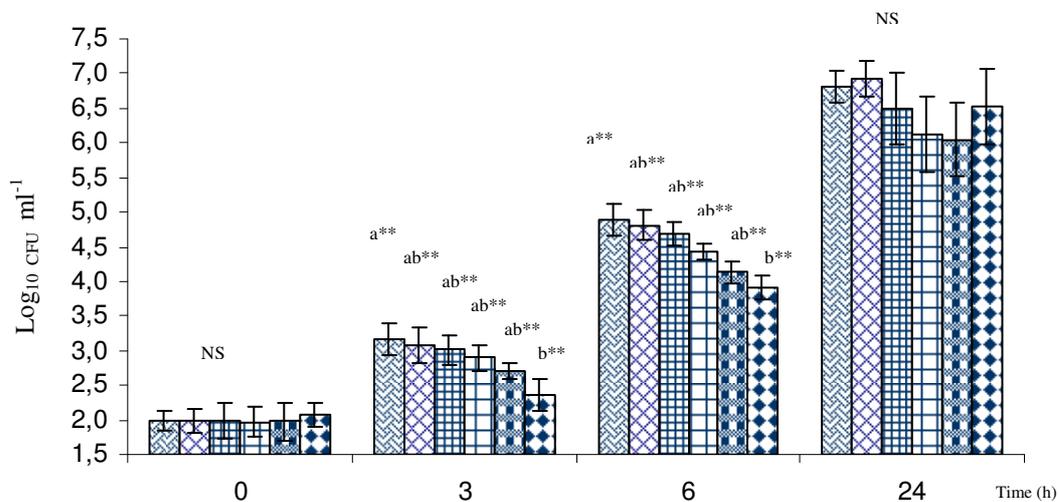
An agar well diffusion assay, as described by Hernandez et al. (2005), was used for the detection of antistaphylococcal activity in the supernatants of co-cultures of *S. aureus* with *Lactococcus* or *Enterococcus* strains in TS buffered medium. The method was modified as following; M17 agar plates (1.5 % agar) were overlaid with 10 ml of BHI agar (0.75 % agar), inoculated with 100 µl of an overnight culture of *S. aureus*. The samples of a 6 h and 24 h old co-cultures of *Lactococcus* or *Enterococcus* strains with *S. aureus* in TS buffered medium were centrifuged to 9600 x g for 15 min at 4°C. The co-culture supernatants were concentrated to 1×10^{-1} of their original volume using an ultrafiltration spin column (Vivaspin, VIVASCIENCE, Hannover, Germany) with a 3000 Da pore size membrane. The concentrated supernatant was deposited in the agar plate wells. The zone of inhibition was visually examined.

2.5. Statistical analysis

pH values, lactate, acetate and amino acid contents in microfiltered milk at 3, 6, and 24 h of incubation, were analyzed by analysis of variance (ANOVA). When the differences were significant, a Newman Keuls test was performed. Statistical correlations between pH values and *S. aureus* counts in microfiltered milk were carried out by calculating Pearson's correlation coefficient.

Fig. 1

Effect of pH values on *S. aureus* count in microfiltered milk after 3, 6 and 24 h of incubation at 33°C.



Values are the means of three experiments. At the same time, letters (a and b) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a and b are classified in decreasing order (a>b). For each time of incubation (0, 3, 6 and 24 h), means with different letters were significantly different by Newman-Keuls statistical test; the significant of the test (NS= non significant, **= $P<0.01$). pH values:  6.65;  6.5;  6.25  6.00;  5.78;  5.60

All the analysis was performed with the software StatSoft (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

3. Results

*3.1. Effect of initial pH values on *S. aureus* growth*

The effect of initial pH value on *S. aureus* growth in microfiltered milk was evaluated (Figure 1). The *S. aureus* count at 3, 6 and 24 h was similar for initial pH values between 6.0 and 6.65. After 6 h of incubation, the *S. aureus* counts were significantly lower in milk initially adjusted at pH 5.60 and 5.78 than those adjusted at pH values above 6.0. At 24 h, whatever the initial pH, there was not significant difference in *S. aureus* counts, even at pH 5.6.

*3.2. Effect of lactic acid bacteria inoculation on *S. aureus* count*

The effect of LAB strains on *S. aureus* counts in microfiltered milks is indicated in Table 1. Without LAB inoculation, *S. aureus* grew through the incubation period to $7.01 \log_{10} \text{CFU ml}^{-1}$ at 24 h. At 3 h, the level of *S. aureus* was significantly the highest in the medium inoculated with *S. aureus* alone. The lowest count similar to the level at 0 h was found in the media inoculated with the two *L. garvieae* strains (Tan1 or Tan2). At 6 h, the level of *S. aureus* was significantly lower in co-cultures with LAB strains. No growth occurred between 3 and 24 h in the media inoculated with *L. lactis* (N650, N658, and N688) or *E. faecalis* N516; whereas the *S. aureus* population increased by 3.5 \log_{10} in the media without inoculation and by less than 1.2 \log_{10} in those with *L. garvieae* strains.

Table 1

S. aureus SA15 and Lactic acid bacteria (LAB) counts with pH values following *S. aureus* SA15 and *Lactococcus* or *Enterococcus* strain co-culture in microfiltered milk.

	Time	Co-culture of <i>S. aureus</i> SA15 with different strains of LAB in microfiltered milk								
		<i>S. aureus</i> SA15	N650	N658	N688	N516	N201	1204	Tan1	Tan2
<i>S. aureus</i> count	0	2.22 ± 0.04	2.17 ± 0.12	2.19 ± 0.12	2.15 ± 0.07	2.14 ± 0.23	2.19 ± 0.18	2.14 ± 0.14	2.17 ± 0.06	2.15 ± 0.13
	3	3.48 ± 0.28 ^{a*}	3.04 ± 0.40 ^{ab*}	3.04 ± 0.29 ^{ab*}	2.96 ± 0.24 ^{ab*}	3.01 ± 0.22 ^{ab*}	3.13 ± 0.25 ^{ab*}	2.93 ± 0.20 ^{ab*}	2.73 ± 0.27 ^{b*}	2.72 ± 0.15 ^{b*}
	6	4.45 ± 0.19 ^{a*}	3.20 ± 0.23 ^{b*}	3.23 ± 0.33 ^{b*}	3.16 ± 0.37 ^{b*}	3.12 ± 0.25 ^{b*}	3.58 ± 0.18 ^{b*}	3.43 ± 0.30 ^{b*}	3.07 ± 0.31 ^{b*}	3.19 ± 0.24 ^{b*}
	24	7.01 ± 0.04 ^{a*}	3.11 ± 0.23 ^{c*}	3.06 ± 0.17 ^{c*}	3.17 ± 0.43 ^{c*}	3.18 ± 0.29 ^{c*}	4.32 ± 0.41 ^{b*}	3.85 ± 0.36 ^{bc*}	3.94 ± 0.72 ^{bc*}	3.66 ± 0.36 ^{bc*}
Lactic Acid Bacteria counts	0	0.00 ± 0.00	8.09 ± 0.12	8.11 ± 0.08	8.17 ± 0.22	8.20 ± 0.20	8.05 ± 0.08	8.14 ± 0.13	8.12 ± 0.12	8.15 ± 0.08
	3	0.00 ± 0.00	8.96 ± 0.21	8.89 ± 0.43	9.00 ± 0.20	9.01 ± 0.23	8.69 ± 0.36	8.62 ± 0.38	8.57 ± 0.32	8.70 ± 0.27
	6	0.00 ± 0.00	9.28 ± 0.19 ^{ab*}	9.42 ± 0.16 ^{a*}	9.44 ± 0.09 ^{a*}	9.70 ± 0.28 ^{a*}	9.05 ± 0.08 ^{ab*}	8.67 ± 0.48 ^{b*}	9.10 ± 0.36 ^{ab*}	8.98 ± 0.28 ^{ab*}
	24	0.00 ± 0.00	9.90 ± 0.46 ^{ab*}	9.52 ± 0.28 ^{ab*}	10.07 ± 0.4 ^{a*}	10.13 ± 0.2 ^{a*}	9.38 ± 0.5 ^{ab*}	9.04 ± 0.25 ^{b*}	9.27 ± 0.46 ^{ab*}	8.92 ± 0.45 ^{b*}
pH values	0	6.72 ± 0.04	6.72 ± 0.04	6.72 ± 0.04	6.72 ± 0.04	6.72 ± 0.04	6.72 ± 0.04	6.72 ± 0.04	6.72 ± 0.04	6.72 ± 0.04
	3	6.68±0.07 ^{a*}	6.17±0.07 ^{de*}	6.23±0.04 ^{cde*}	6.08 ± 0.12 ^{e*}	6.16 ± 0.08 ^{de*}	6.46 ± 0.04 ^{b*}	6.46 ± 0.03 ^{b*}	6.31± 0.01 ^{cd*}	6.35 ± 0.04 ^{bc*}
	6	6.70 ± 0.08 ^{a*}	5.60 ± 0.27 ^{c*}	5.58 ± 0.09 ^{c*}	5.26 ± 0.38 ^{c*}	5.42 ± 0.28 ^{c*}	6.41 ± 0.05 ^{ab*}	6.41 ± 0.02 ^{ab*}	6.24 ± 0.03 ^{b*}	6.28 ± 0.05 ^{ab*}
	24	6.72 ± 0.08 ^{a*}	4.37 ± 0.09 ^{d*}	4.31 ± 0.09 ^{d*}	4.36 ± 0.13 ^{d*}	4.31 ± 0.07 ^{d*}	6.28 ± 0.04 ^{b*}	6.40 ± 0.03 ^{b*}	5.91 ± 0.13 ^{c*}	5.87 ± 0.38 ^{c*}

The results of bacterial count are expressed as log₁₀ CFU ml⁻¹ of microfiltered milk. Values are the means of three experiments with each strain. In the same line, letters (a, b, c, d and e) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b, c, d and e are classified in decreasing order (a>b>c>d>e). For each time of incubation (0, 3, 6 and 24 h), means in the same line with different letters were significantly different by Newman-Keuls statistical test; the significant of the test (no letter= non significant, * = P<0.05)

There were significant differences in *S. aureus* counts after 24 h of incubation, depending on the LAB strains inoculated. At 24 h, the *S. aureus* counts in milks inoculated with *L. garvieae* strains (N201, Tan 1, Tan 2, and 1204) ($< 4.4 \log_{10}$) were higher than that in the medium with *L. lactis* (N650, N658, and N688) or *E. faecalis* N516 ($< 3.17 \log_{10}$) but significantly lower than that in the control without inoculation ($7.01 \log_{10}$).

At 6 h, the pH of milk inoculated with *L. lactis* or *E. faecalis* was significantly lower than that found in the two milk samples inoculated with *S. aureus* alone and with *S. aureus* and *L. garvieae* (Table 1). After 6 h of incubation pH values in milks inoculated with *L. garvieae* were lower than that inoculated with *S. aureus* alone, although the difference was not statistically significant. At 24 h, the pH value of the milk inoculated with *L. garvieae* was significantly lower than that found in milk with *S. aureus* alone.

3.3. Amino acid content and *S. aureus* count

Amino acids were quantified in the culture supernatants from microfiltered milk samples inoculated with *S. aureus* alone or with *L. garvieae* N201, *L. lactis* N658, or *E. faecalis* N516 (Table 2).

Arginine, cysteine and tryptophan were never detected in non-inoculated or inoculated milk at any time during incubation.

At 6 and 24 h, supernatants of co-cultures with *L. lactis* or *E. faecalis* strains were characterized by the highest levels of aspartic acid, glutamic acid, histidine, valine, methionine, isoleucine, phenylalanine, alanine, tyrosine, leucine, lysine, proline even if the level of valine, methionine and leucine tended to decrease between 6 and 24 h. The decrease in valine, methionine,

Table 2

Concentration of amino acids ($\mu\text{mol l}^{-1}$) in microfiltered milk (0 h) or in the microfiltered milk inoculated with *S. aureus* SA15 alone or *S. aureus* SA15 with *L. garvieae* (N201), *L. lactis* subsp. *lactis* (N658), or *E. faecalis* (N516) at 3, 6 and 24 h.

Time	0 (h)	3 (h)				6 (h)				24 (h)				
		Milk	SA15 in co-culture with				SA15	SA15 in co-culture with			SA15	SA15 in co-culture with		
			<i>S. aureus</i> SA15	<i>L. garvieae</i> N201	<i>L. lactis</i> N658	<i>E. faecalis</i> N516		<i>L. garvieae</i> N201	<i>L. lactis</i> N658	<i>E. faecalis</i> N516		<i>L. garvieae</i> N201	<i>L. lactis</i> N658	<i>E. faecalis</i> N516
Asp	15 ± 2	11 ± 2 ^{b*}	20 ± 4 ^{b*}	63 ± 25 ^{a*}	59 ± 11 ^{a*}	14 ± 2 ^{b**}	25 ± 3 ^{b**}	60 ± 9 ^{a**}	64 ± 13 ^{a**}	12 ± 3 ^{d**}	25 ± 5 ^{c**}	58 ± 6 ^{a**}	45 ± 3 ^{b**}	
Glu	298 ± 18	287 ± 11	310 ± 23	405 ± 103	396 ± 106	275 ± 11 ^{b**}	289 ± 11 ^{b**}	540 ± 106 ^{a**}	595 ± 97 ^{a**}	274 ± 23 ^{c*}	282 ± 22 ^{c*}	693 ± 57 ^{a*}	590 ± 72 ^{b*}	
His	0 ± 0	0 ± 0 ^{b**}	0 ± 0 ^{b**}	26 ± 11 ^{a**}	4 ± 8 ^{b**}	0 ± 0 ^{b**}	0 ± 0 ^{b**}	31 ± 5 ^{a**}	6 ± 11 ^{b**}	0 ± 0 ^{c*}	3 ± 6 ^{c*}	31 ± 8 ^{a*}	20 ± 4 ^{b*}	
Gly	91 ± 9	88 ± 8	86 ± 34	41 ± 28	54 ± 5	91 ± 5 ^{a*}	62 ± 13 ^{b*}	22 ± 5 ^{c*}	61 ± 17 ^{b*}	118 ± 22 ^{a**}	43 ± 11 ^{b**}	12 ± 11 ^{b**}	44 ± 16 ^{b**}	
Val	17 ± 2	18 ± 1	26 ± 2	64 ± 48	53 ± 31	17 ± 0 ^{b**}	18 ± 6 ^{b**}	99 ± 26 ^{a**}	83 ± 25 ^{a**}	17 ± 1 ^{c*}	7 ± 6 ^{d*}	55 ± 3 ^{a*}	26 ± 2 ^{b*}	
Met	4 ± 7	4 ± 8	4 ± 8	30 ± 12	15 ± 16	0 ± 0 ^{b*}	0 ± 0 ^{b*}	40 ± 8 ^{a*}	20 ± 18 ^{b*}	0 ± 0 ^{b**}	0 ± 0 ^{b**}	18 ± 1 ^{a**}	0 ± 0 ^{b**}	
Ile	17 ± 3	14 ± 5	18 ± 2	23 ± 11	16 ± 15	15 ± 2 ^{b*}	10 ± 9 ^{b*}	33 ± 8 ^{a*}	28 ± 5 ^{a*}	16 ± 4 ^{ab*}	4 ± 8 ^{b*}	21 ± 7 ^{a*}	17 ± 1 ^{ab*}	
Phe	4 ± 8	11 ± 2 ^{b*}	14 ± 1 ^{b*}	41 ± 20 ^{a*}	43 ± 8 ^{a*}	12 ± 2 ^{c*}	12 ± 2 ^{c*}	72 ± 8 ^{a*}	56 ± 9 ^{b*}	12 ± 2 ^{c*}	3 ± 6 ^{d*}	50 ± 4 ^{a*}	28 ± 3 ^{b*}	
Thr	7 ± 7	10 ± 1	0 ± 0	7 ± 6	3 ± 5	10 ± 1 ^{a*}	0 ± 0 ^{b*}	10 ± 2 ^{a*}	4 ± 8 ^{ab*}	3 ± 5	0 ± 0	10 ± 1	10 ± 9	
Ser	19 ± 3	19 ± 4	27 ± 6	49 ± 39	31 ± 18	19 ± 3 ^{b*}	20 ± 3 ^{b*}	47 ± 15 ^{a*}	36 ± 27 ^{ab*}	14 ± 3	18 ± 4	22 ± 3	22 ± 5	
Ala	38 ± 5	36 ± 4	43 ± 6	108 ± 56	113 ± 32	37 ± 2 ^{b**}	35 ± 7 ^{b**}	145 ± 18 ^{a**}	156 ± 74 ^{a**}	34 ± 3	34 ± 10	49 ± 1	48 ± 14	
Tyr	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	79 ± 56	22 ± 39	0 ± 0 ^{b**}	0 ± 0 ^{b**}	148 ± 17 ^{a**}	57 ± 10 ^{b**}	0 ± 0 ^{c**}	0 ± 0 ^{c**}	114 ± 5 ^{a**}	44 ± 13 ^{b**}	
Nva	58 ± 5	61 ± 5 ^{a**}	60 ± 1 ^{a**}	61 ± 11 ^{a**}	15 ± 18 ^{b**}	64 ± 11 ^{a**}	59 ± 6 ^{a**}	61 ± 4 ^{a**}	13 ± 9 ^{b**}	66 ± 7 ^{a*}	59 ± 7 ^{a*}	61 ± 6 ^{a*}	21 ± 25 ^{b*}	
Leu	12 ± 2	14 ± 1	21 ± 2	103 ± 104	94 ± 54	16 ± 4 ^{b**}	15 ± 3 ^{b**}	203 ± 29 ^{a**}	188 ± 316 ^{a**}	14 ± 2 ^{c**}	13 ± 1 ^{c**}	124 ± 9 ^{a**}	72 ± 7 ^{b**}	
Lys	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	130 ± 132	109 ± 96	0 ± 0 ^{b**}	0 ± 0 ^{b**}	265 ± 2 ^{a**}	236 ± 18 ^{a**}	0 ± 0 ^{c**}	0 ± 0 ^{c**}	268 ± 18 ^{a**}	217 ± 19 ^{b**}	
Pro	0 ± 0	0 ± 0 ^{b*}	0 ± 0 ^{b*}	364 ± 151 ^{a*}	391 ± 130 ^{a*}	0 ± 0 ^{b**}	0 ± 0 ^{b**}	552 ± 152 ^{a**}	544 ± 57 ^{a**}	0 ± 0 ^{b*}	0 ± 0 ^{b*}	492 ± 143 ^{a*}	508 ± 109 ^{a*}	

Values are the mean of three experiments with each strain. In the same line for each incubation time, 3, 6 and 24 h, the letters (a,b,c,d) indicate homogeneous statistical processing groups for each amino acid. Numbers with different letters are not equal. a, b, c and d are classified in decreasing order (a>b>c>d). For each time of incubation (3, 6 and 24 h), means in the same line with different letters were significantly different by Newman-Keuls statistical test; the significant of the test (no letter= non significant, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$). Limit of detection was 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Arginine, tryptophan and cysteine were never detected in microfiltered milk at 0 h or in inoculated milk with *S. aureus* alone or with LAB at any time during incubation. Asp= aspartic acid; Glu= glutamic acid; His= histidine; Gly= glycine; Val= valine; Met= methionine; Ile= isoleucine; Phe= phenylalanine; Thr= threonine; Ser= serine; Ala= alanine; Tyr= tyrosine; Nva= norvaline; Leu= leucine; Lys= lysine; Pro= proline.

alanine, and leucine was particularly marked between 6 and 24 h and was the strongest with *E. faecalis*. In contrast, the 6 and 24 h media inoculated with *S. aureus* alone or *S. aureus* and *L. garvieae* exhibited the lowest concentration of these amino acids. Histidine, tyrosine, lysine and proline were not detected in microfiltered milk at 0 h or during the incubation in the media inoculated with *S. aureus* alone. Glycine content decreased during incubation in media with *Lactococcus* or *Enterococcus* strains, markedly so with *L. lactis*. In medium inoculated with *L. garvieae*, valine, methionine, isoleucine and threonine contents tended to decrease throughout the incubation period, and were the lowest after 24 h. In medium inoculated with *S. aureus* alone, the amino acid contents of aspartic acid, glutamic acid, glycine, valine, isoleucine, serine, alanine, norvaline and leucine did not change a lot ($< 10 \mu\text{mol l}^{-1}$) throughout the incubation.

Adding $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ of each amino acid, valine, methionine, isoleucine, phenylalanine and threonine to the microfiltered milk did not modify *S. aureus* or *L. garvieae* N201 growth and did not modify pH values. It did not suppress the inhibition by *L. garvieae* N201.

3.4. S. aureus count and the concentration of lactate and acetate in microfiltered milk

After 24 h of incubation, concentrations of D-lactate and of acetate were very low ($< 0.5 \text{ g l}^{-1}$) in microfiltered milk inoculated with *S. aureus* and *L. lactis* N658 or *E. faecalis* N516. L-lactate, D-lactate and acetate were not detected in microfiltered milk inoculated with *S. aureus* alone or in co-culture with *L. garvieae* N201. At 24 h, L-lactate was only measured in milk inoculated with strains of *L. lactis* or *E. faecalis* at concentrations 6.3 g l^{-1} (Table 3).

Table 3

L-acid lactic, D-acid lactic, acetic acid contents (g l^{-1}) in microfiltered milk inoculated with *S. aureus* SA15 alone and in co-culture with *L. garvieae* (N201), *L. lactis* subsp. *lactis* (N658), or *E. faecalis* (N516).

Time	L-lactate			D-lactate			Acetic acid		
	3 h	6 h	24 h	3 h	6 h	24 h	3 h	6 h	24 h
<i>S. aureus</i> SA15 SA15 in co-culture	0.01±0.01 ^b	0.02±0.03 ^b	0.01±0.01 ^b	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.02±0.01 ^d	0.03±0.01 ^c	0.02±0.01 ^c
+ <i>L. garvieae</i> N201	0.39 ± 0.07 ^b	0.49 ± 0.12 ^b	0.90 ± 0.17 ^b	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.05±0.01 ^c	0.04±0.02 ^c	0.04±0.00 ^c
+ <i>L. lactis</i> N658	1.94 ± 0.89 ^a	3.63 ± 0.60 ^a	6.36 ± 2.05 ^a	0.23±0.01	0.19±0.15	0.34±0.19 ^a	0.39±0.03 ^a	0.41±0.02 ^a	0.37±0.03 ^a
+ <i>E. faecalis</i> N516	1.31 ± 0.13 ^a	4.42 ± 0.60 ^a	6.37 ± 1.55 ^a	0.21±0.12	0.19±0.08	0.12±0.01 ^b	0.12±0.01 ^b	0.14±0.02 ^b	0.17±0.01 ^b
<i>P</i>	**	**	**	NS	NS	*	**	**	**

Values are the mean of three experiments with each strain. In the same column, letters (a, b, c and d) indicate homogeneous statistical processing groups. Numbers with different letters are not equal. a, b, c and d are classified in decreasing order (a>b>c>d). For each time of incubation (3, 6 and 24 h), means in the same column with different letters were significantly different by Newman-Keuls statistical test; the significant of the test (NS= non significant, * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$).

At 6 h, the *S. aureus* count was slightly correlated with milk pH values ($r = 0.29$; $p < 0.05$ $n = 27$). At 24 h, there was a positive correlation between the pH values and *S. aureus* count ($r = 0.74$; $p < 0.05$ $n = 27$).

3.5. Effect of Lactococcus or Enterococcus strains on S. aureus growth in buffered media

In TS medium buffered at pH 6.8, the differences in *S. aureus* count between the control and co-culture assays were not statistically significant 3 and 6 h after inoculation. The *S. aureus* count was significantly lower only after 24 h of incubation in the medium inoculated with *Lactococcus* or *Enterococcus* strains than in that with *S. aureus* alone (Table 4). The pH of all media remained stable at 6.8 throughout the incubation, with or without LAB. L-lactate, D-lactate or acetate was not detected in the supernatants of cultures inoculated with *S. aureus* alone or with the LAB throughout the incubation.

The concentrated supernatants of the co-culture of *L. garvieae* N201, *L. lactis* N658 and *E. faecalis* N516 with *S. aureus* in TS buffered medium after 6 and 24 h of incubation did not produce any inhibition zone against *S. aureus* tested on agar plate according to the method of Hernandez et al. (2005).

4. Discussion

Staphylococcus aureus can be inhibited by *L. lactis*, *E. faecalis* and *L. garvieae* after only 6 h of incubation in microfiltered milk. In microfiltered milk, *L. lactis* and *E. faecalis* can inhibit *S. aureus* by acidic pH values or lactic acid production. This did not occur during the inhibition of *S. aureus* by *L. garvieae*. After 6 h of incubation, *S. aureus* was inhibited by *L. garvieae* whereas the pH

Table 4

Counts of *S. aureus* SA15, *L. garvieae* (N201), *L. lactis* subsp. *lactis* (N658), and *E. faecalis* (N516) in TS-buffered medium.

Time (h)	<i>S. aureus</i> SA15 counts (log ₁₀ CFU ml ⁻¹)				Lactic acid bacteria counts (log ₁₀ CFU ml ⁻¹)			
	0	3	6	24	0	3	6	24
<i>S. aureus</i> SA15	2.25 ± 0.05	2.98 ± 0.30	3.44 ± 0.22	5.05 ± 0.27 ^{a*}	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
SA15+ <i>L. garvieae</i> N201	2.19 ± 0.12	2.84 ± 0.27	3.04 ± 0.30	3.78 ± 0.21 ^{b*}	8.12 ± 0.12	9.25 ± 0.57	9.28 ± 0.59	9.46 ± 0.39
SA15+ <i>L. lactis</i> N658	2.24 ± 0.09	2.88 ± 0.42	3.10 ± 0.35	3.77 ± 0.05 ^{b*}	8.14 ± 0.21	9.27 ± 0.43	9.33 ± 0.33	9.57 ± 0.38
SA15+ <i>E. faecalis</i> N516	2.22 ± 0.11	3.00 ± 0.11	3.35 ± 0.16	4.06 ± 0.17 ^{b*}	8.09 ± 0.19	9.22 ± 0.41	9.23 ± 0.21	9.29 ± 0.47

Values are the mean of three experiments with each strain. In the same column, letters (a and b) indicate homogeneous statistical processing groups. a and b are classified in decreasing order (a>b). For each time of incubation (3, 6 and 24 h), means in the same column with different letters were significantly different by Newman-Keuls statistical test; the significant of the test (no letter= non significant, * = $P<0.05$)

values were above 6.0. Moreover *L. garvieae* produced slight quantity of lactic acid. In TS medium buffered at pH 6.8 for the entire LAB tested, the inhibition of *S. aureus* growth occurred without acid production, drop of pH, bacteriocin production. It can be due to other factors. pH has been often described as an important factor to control *S. aureus* in cheese. Indeed, Meyrand et al. (1999) reported that *S. aureus* was inhibited in lactic goat cheeses with a pH 4.5 at the end of draining. In the same way, the growth of *S. aureus* in non-cooked semi hard cheeses was dependant on the pH values (Delbes et al. 2006). Stecchini et al. (1991) indicated that the inhibitory effect of the starter culture on *S. aureus* growth was not only due to the decrease in pH.

In our study, the inhibition could not be due to the production of antistaphylococcal substances in supernatant. Strains of *Enterococcus* and *L. garvieae* were able to produce bacteriocin, respectively enterocin (Giraffa 2003; Leroy et al. 2003) and garviecin L1-5 (Villani et al. 2001). Nevertheless, as in our study, Ammor et al (2006) failed to detect antimicrobial substances in culture supernatants inhibiting *S. aureus* growth.

Histidine, tyrosine, lysine, proline, arginine, tryptophan and cysteine were not detected in microfiltered milk. Through incubation, they were not produced in the milk inoculated with *S. aureus* alone. Moreover, *S. aureus* alone during its growth did not metabolise aspartic acid, glutamic acid, valine, isoleucine, serine, alanine, and leucine. Nevertheless, *S. aureus* can growth which seems to indicate that these amino acids are not essential to its growth in microfiltered milk. The content of most amino acids increased during incubation, so they are not limiting factor for the *S. aureus* growth. It would be surprising that this level of amino acids in media with *L. lactis* and *E. faecalis*

are involved in the inhibition. The proteolytic and peptidase activities of these two species have been largely described (Wallace and McKain 1997; Macedo et al. 2000; Boutrou et al. 2001; Kranenburg et al. 2002). After 6 h of incubation, methionine was totally metabolised by *S. aureus* alone or in co-culture with *L. garvieae* whereas, threonine was only metabolised in milk inoculated with *L. garvieae*.

Our result did not agree with the amino acid requirement described in the literature. These disagreements between our results and those from other studies could result from differences in culture media and incubation conditions. Lincoln et al (1995) found that seven *S. aureus* strains required arginine, proline, cystine, valine, leucine and glycine for their growth but they performed their study in a chemically defined medium at 37°C. The same result was obtained by Onoue and Mori (1997) in a chemically-defined medium. Keller et al (1978) observed that *S. aureus* could utilize glutamate, proline, histidine, aspartate, alanine, threonine, serine, or glycine as a major energy source.

Further studies are in progress to identify the mechanisms involved in the inhibition of *S. aureus* by *L. garvieae*. Before proposing *L. garvieae* as antistaphylococcal bacteria, its antagonistic properties in cheese will be tested. It is obvious that the safety of *L. garvieae* strain will be also checked according to Qualified Presumption of Safety (QPS) approach as proposed by the European Food Safety Authority.

Acknowledgements

The authors would like to thank Jean Bernard Millière for his helpful advices and Harriet Coleman for English proof reading.

Reference

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., and Chevallier, I.(2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1--Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 17, 454-461.

Arques, J. L., Rodriguez, E., Gaya, P., Medina, M., Guamis, B. and Nunez, M. (2005) Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 98, 254-260.

Boutrou, R., Mollé, D. and Léonil, J. (2001) Action of the lactococcal proteinase during Camembert-type curd making. *Int. Dairy. J.* 11, 347-354.

Callon, C., Berdagué, J.L., Dufour, E. and Montel, M.C. (2005) The effect of raw milk microbial flora on the sensory characteristics of Salers-Type cheeses. *J. Dairy. Sci.* 88, 3840-3850.

Callon, C., Millet, L. and Montel, M. C. (2004) Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *J. Dairy. Res.* 71, 231-244.

Chassagne, M., Barnouin, J. and Le Guenic, M. (2005) Expert assessment study of milking and hygiene practices characterizing very low somatic cell score herds in France. *J. Dairy. Sci.* 88,1909-1916.

De Buyser, B. Lombard, M.L., Schulten, S.M., Veld, P.H. int., Scotter, S. L., Rollier, P. and Labellec,C. (2003) Validation of EN ISO Standard methods 6888 part 1 and 2: 1999- enumeration of coagulase-positive Staphylococci in food. *Int. j. Food Microbiol.* 83: 185 – 194.

De Buyser, M. L., Dufour, B., Maire, M. and Lafarge, V. (2001) Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *Int. J. Food. Microbiol.* 67, 1-17.

Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F. and Montel, M.C. (2006) *Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin Production during Manufacture of Non-Cooked, Semi-Hard Cheese from Cow's Raw Milk . *J. Food. Prot.* 69, 2161-2167.

Feeney, E.P., Guinee, T.P. and Fox, P.F. (2002) Effect of pH and calcium concentration on some textural and functional properties of mozzarella cheese. *J. Dairy. Sci.* 85, 1646-1654.

Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food. Microbiol.* 88, 215-222.

Gomez-Lucia E., Goyache, J. and Orden, J. A. (1992) Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of experimental Manchego-type cheese. *J. Dairy. Sci.* 75, 19-26.

Hamama, A., El Hankouri, N. and El Ayadi, M. (2002) Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *Int. Dairy. J.* 12, 933 - 938.

Hernandez, D., Cardell, E. and Zarate, V. (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J. Appl. Microbiol.* 99, 77-84.

Jersek, B., Gilot, P. and Gubina, M. (1999) Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence- based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 37, 103-109.

Keller, G.M., Hanson, R. S. and Bergdoll, M. S. (1978) Molar growth yields and enterotoxin B production of *Staphylococcus aureus* with amino acids as energy sources. *Infect. Immun.* 20, 151-157.

Kranenburg, R.V., Kleerebezem, M., Hylckama Vlieg, J.V., Ursing, B.M., Boekhorst, J., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G., and Siezen, R.J. (2002) Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: productions from genome sequence analysis. *Int. Dairy. J.* 12, 111-121.

Lamprell, H. (2003) La production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus* Université de Bourgogne - Sciences de l'Alimentation - Spécialité: Microbiologie.

Leroy, F., Foulquie Moreno, M.R. and De Vuyst, L. (2003) *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *Int. J. Food. Microbiol.* 88, 235-240.

Lincoln, R.A., Leigh, J. A. and Jones, N. C. (1995) The amino acid requirements of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* 45, 275 - 279.

Macedo,A.C., Vieira, M., Poças, R. and Malcata, F.X. (2000) Peptide hydrolase system of lactic acid bacteria isolated from serra da Estrela cheese. *Int. Dairy. J.* 10, 769 -774.

Meyrand, A., Boutrand-Loei, S. and Ray-Gueniot, S. (1998) Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *J. Appl. Microbiol.* 85, 537 - 544.

Meyrand, A., Vernozy-Rozand, C., Gonthier, A., Mazuy, C., Ray-Gueniot, S., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C. and Richard, Y. (1999) Main differences in behavior and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in two different raw milk cheeses. *Revue. Méd. Vét.* 150, 271-278.

Miteva, V., Ivanova, I. and Budakov, I. (1998) Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043. *J. Appl. Microbiol.* 85, 603-614.

Onoue, Y. and Mori, M. (1997) Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. *Int. J. Food. Microbiol.* 36, 77-82.

Otero, M. and Nader-Macias, M. E. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Repro Sci* 96, 35-46.

Sesques, M. (1994) Staphylocoques à coagulase positive dans le fromage fermier au lait cru de Saint-Nectaire: Origine, développement et risques de production d'entérotoxines. Université Claude Bernard de Lyon I.

Sommerhauser, J., Kloppert, B., Wolter, W., Zschock, M., Sobiraj, A. and Failing, K. (2003) The epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections from subclinical mastitis in dairy cows during a control programme. *Vet. Microbiol.*

96, 91-102.

Stecchini, M. L., Sarais, I. and Bertoldi, M. d. (1991) The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. *Int. J. Food. Microbiol.* 14, 99-109.

Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J. M., Ivanova, I. and Dousset, X. (1999) Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *Int. J. Food. Microbiol.* 48, 167-177.

Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. and Moschetti, G. (2001) Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J. Appl. Microbiol.* 90, 430-439.

Wallace, R.J. and Mckain, N. (1997) Peptidase Activity of Human Colonic Bacteria. *Anaerobe* 3, 251-257.

Zottola, E. A., Yezzi, T. L., Ajao, B. D. and Roberts, R. F. (1994) Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent other foods. *Int. J. Food. Microbiol.* 24, 227-238.

CHAPITRE 3

Effet de la température et du pH sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et sa production d'entérotoxines en co-culture avec une souche inhibitrice de *Lactococcus garvieae*

Effect of temperature and pH on the growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*

Alomar J., Lebert A. and Montel M. C.

Current Microbiology 2007. (Soumis)

Tableau 22: Evolution de *S. aureus* SA15, *L. garvieae* N201 et la valeur de pH en fonction du temps dans différents milieux de culture.

Milieux	Condition	Niveau de <i>S. aureus</i> SA15 à				Niveau de <i>L. garvieae</i> N201 à				Valeur de pH à			
		0 h	3 h	6 h	24 h	0 h	3 h	6 h	24 h	0 h	3 h	6 h	24 h
Lait	SA15	2,23	3,42	4,43	7,01				0,00	6,72	6,68	6,7	6,72
Lait	SA15+N201	2,19	3,06	3,49	4,32	8,05	8,69	9,05	9,38	6,72	6,46	6,41	6,28
MB	SA15	2,56	2,98	3,44	5,05				0,00	6,8	6,8	6,8	6,8
MB	SA15 +N201	2,52	2,84	3,04	3,78	8,30	9,25	9,28	9,46	6,8	6,8	6,8	6,8
MB1	SA15	2,08	2,90	4,24	7,04				0,00	7,03	7,05	7,04	4,93
MB1	SA15+N201	2,08	2,04	2,00	2,04	8,04	8,65	8,92	10,30	7,07	6,25	4,6	4,46
MB2	SA15	2,04	1,95	4,29	7,17				0,00	6,89	7,09	7,07	4,85
MB2	SA15+N201	2,06	2,00	1,95	2,00	8,36	8,41	9,18	10,48	6,83	6,4	4,62	4,75
MB3	SA15	2,06	2,00	2,60	5,00				0,00	6,93	7,1	7,13	6,2
MB3	SA15+N201	2,00	2,18	2,29	2,65	8,00	8,57	9,35	9,29	6,9	6,25	6,06	6,07
TPYC	SA15	2,28	3,61	4,90	8,04				0,00	7,32	7,24	7,21	7,04
TPYC	SA15+N201	2,20	2,26	2,88	3,97	8,00	8,95	9,16	9,65	7,32	6,83	6,87	6,83
TPYC+Cr	SA15	2,19	3,86	5,03	7,90				0,00	7,35	7,18	7,25	7,09
TPYC+Cr	SA15+N201	2,27	2,30	2,86	3,57	8,00	9,28	9,33	9,47	7,26	6,25	6,25	6,27
CCr	SA15	2,16	3,70	4,53	7,68				0,00	7,31	7,24	7,24	7,23
CCr	SA15+N201	2,22	2,65	2,28	2,07	8,00	8,30	8,49	9,13	7,28	7,06	6,98	6,68

La composition des milieux est précisée dans le tableau 15.

Chapitre 3: Effet de la température et du pH sur la croissance de *Staphylococcus aureus* et sa production d'entérotoxines en co-culture avec une souche inhibitrice de *Lactococcus garvieae*.

3.1. Objectif

Cette étude avait pour objectif d'étudier l'effet de la concentration de *L. garvieae*, de la température d'incubation et du pH sur la croissance de *S. aureus* et sa production d'entérotoxines en co-culture avec *L. garvieae* dans un milieu de laboratoire (TPYC).

3.2. Méthodologie

Le protocole expérimental correspondant à cette partie est présenté dans les paragraphes 4.1 à 4.4 de la partie matériel et méthodes. La croissance de *S. aureus* SA15 et la production d'entérotoxines ont été étudiées en milieu TPYC (Tryptone, Peptone, Yeast extract, Casein) (cf. composition de milieu annexe 2) en faisant varier les facteurs -concentration de *L. garvieae* N201, température d'incubation, pH du milieu- selon un plan expérimental de Doehlert. Le milieu lait microfiltré n'a pas pu être choisi pour cette étude car il est difficile d'ajuster le pH à des valeurs voisines de 5,0 avec de l'acide lactique sans coagulation du lait. Dans des essais préliminaires, nous avons évalué la croissance de *S. aureus* dans divers milieux. Le milieu TPYC a été choisi en raison de la bonne croissance de *S. aureus* sur ce milieu et l'absence de diminution de pH après inoculation de *L. garvieae* N201 (cf. Tableau 22).

4.3. Résultats

Les résultats ont été synthétisés dans l'article: Alomar J., Lebert A., Montel M. C. (2007) *Effect of temperature and pH on the growth of Staphylococcus aureus in co-culture with Lactococcus garvieae*. Cet article est soumis dans « *Current Microbiology* ».

Nos résultats ont permis d'écrire un modèle de croissance de *S. aureus* en milieu de laboratoire en intégrant les facteurs, concentration de *L. garvieae* N201, température d'incubation et valeur de pH selon l'équation suivante:

Croissance de *S. aureus* (\log_{10} ufc/ml) = $b_0 + b_1.[N201] + b_2.(T^\circ C) + b_3.(pH) + b_{11}.[N201]^2 + b_{22}.(T^\circ C)^2 + b_{33}.(pH)^2 + b_{12}.[N201].(T^\circ C) + b_{13}.[N201].(pH) + b_{23}.(T^\circ C).(pH)$

Tableau 23: Coefficients de régression obtenues pour l'effet de la température, pH et concentration de *L. garvieae* N201 sur la croissance de *S. aureus* SA15 à 3, 6, 9, 24 et 48 h.

Facteur	Coefficient	3 h	6 h	9 h	24 h	48 h
	b ₀	+0,250 [*]	+0,398 ^{***}	+0,649 ^{***}	+1,892 ^{***}	+4,708 ^{***}
	linéaire					
N _{N201}	b ₁	-0,376 ^{**}	-0,431 ^{***}	-0,380 ^{**}	-0,492 ^{**}	-0,776 ^{**}
T	b ₂	+0,269 [*]	+0,502 ^{***}	+0,696 ^{***}	+2,142 ^{***}	+2,554 ^{***}
pH	b ₃	-0,106 ^{NS}	+0,105 ^{NS}	+0,200 [*]	+1,479 ^{***}	+2,049 ^{***}
	Quadratique					
N _{N201} ²	b ₁₁	+0,237 ^{NS}	+0,425 ^{**}	+0,452 ^{**}	+0,570 [*]	-0,497 ^{NS}
T ²	b ₂₂	-0,0364	+0,043 ^{NS}	-0,077 ^{NS}	+0,248 ^{NS}	-2,133 ^{***}
pH ²	b ₃₃	-0,361 [*]	-0,465 ^{**}	-0,506 ^{**}	-0,993 ^{**}	-3,228 ^{***}
	Interaction					
N _{N201} .T	b ₁₂	-0,425 ^{NS}	+0,099 ^{NS}	-0,320 ^{NS}	+0,300 ^{NS}	-0,456 ^{NS}
N _{N201} .pH	b ₁₃	-0,112 ^{NS}	+0,341 [*]	+0,513 [*]	+0,480 ^{NS}	+0,246 ^{NS}
T.pH	b ₂₃	+0,053 ^{NS}	+0,246 ^{NS}	+0,212 ^{NS}	+2,164 ^{***}	+2,692 ^{***}
R ²		0,89	0,97	0,97	0,99	0,99

NS= non significatif, * = 0,01 < P < 0,05, ** = 0,001 < P < 0,01, *** = P < 0,001.

Les valeurs des coefficients sont précisées dans le tableau 23.

La concentration initiale de *L. garvieae* a un effet inhibiteur très significatif sur la croissance de *S. aureus* à 3, et 6 h et n'est plus que significatif après 9, 24 et 48 h. L'augmentation de la température d'incubation combinée avec l'augmentation du pH du milieu favorise la croissance de *S. aureus* après 24 et 48 h d'incubation et l'effet inhibiteur de *L. garvieae* diminue.

Le pH initial n'a pas d'effet significatif sur la croissance de *S. aureus* jusqu'à 9 h d'incubation ce qui corrobore les résultats sur la croissance de *S. aureus* présentés dans le premier chapitre. Il était en effet noté que l'accroissement des *Staphylococcus* coagulase positive entre 6 et 24 h n'était corrélé qu'au pH à 6 h.

A 6 h d'incubation, à un pH initial de 5,9 et une température de 22°C, *S. aureus* ne se développe pas si la concentration initiale de *L. garvieae* est de 7,8 log₁₀ ufc/ml. Si la concentration initiale de *L. garvieae* est importante, la croissance de *S. aureus* n'est pas influencée par la température entre 22 et 34°C alors qu'à plus faible concentration de *L. garvieae*, elle augmente quand la température augmente.

Après 24 h d'incubation, l'effet inhibiteur de *L. garvieae* est moins effectif. A 20°C à pH 5,9, *S. aureus* ne se développe pas si la concentration initiale de *L. garvieae* est de 6,5 log₁₀ ufc/ml. En revanche, lorsque la température augmente, *L. garvieae* n'est plus inhibiteur même à forte concentration. De même, l'augmentation de la concentration de *L. garvieae* limite la croissance de *S. aureus* à pH 5 après 24 h d'incubation à température inférieure à 30°C.

Des entérotoxines n'ont été détectées qu'après 48 h d'incubation dans une seule condition: à pH 6,8 et à une température de 30°C, avec une concentration initiale de *L. garvieae* de 7,5 log₁₀ ufc/ml.

Les résultats nous ont conduit à approfondir la nature de l'inhibition sous jacente de *S. aureus* en présence de *L. garvieae*.

Effect of temperature and pH on the growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*

JOMAA ALOMAR¹, ANDRE LEBERT² AND MARIE CHRISTINE. MONTEL.^{1*}

¹INRA URF 545, Unité Recherches Fromagères, 36, rue de Salers, F-15000 Aurillac, France

² INRA UR 370, Unité Recherches Qualité des Produits Animaux, Theix F-63122 Saint-Genès Champanelle

Running head: Effect of temperature, pH, *Lactococcus* on *Staphylococcus* growth

Corresponding author: M.-C. MONTEL, INRA, Unité Recherches Fromagères, 36, rue de Salers, F-15000 Aurillac, France

- E-mail: cmontel@clermont.inra.fr
- Tel: 33 (0) 4 71 45 64 11; Fax: 33 (0) 4 71 45 64 13

Effect of temperature and pH on the growth of *Staphylococcus aureus* in co-culture with *Lactococcus garvieae*

Abstract

Staphylococcus aureus growth and enterotoxins production in co-culture with *Lactococcus garvieae* was studied in a laboratory medium as function of temperature of incubation and pH values. Doehlert experimental design was used to study the effect of concentration of *L. garvieae*, temperature and pH on *S. aureus* growth. The inhibition of *S. aureus* growth by *L. garvieae* was more important during the first six hours of incubation and its effect increased when its concentration increased. After 24 and 48 h, the effect of *L. garvieae* decreased and the growth of *S. aureus* was positively influenced by higher values of temperature and pH. Staphylococcal enterotoxins were only detected in one set of conditions: after 48 h of incubation at 30°C and pH 6.8. Our results argue for favouring *L. garvieae* very early in the cheese process.

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus can produce enterotoxins that are responsible for food borne diseases associated with milk and milk products (Simeao do Carmo et al. 2002). The European regulation sets the upper limit for *S. aureus* in cheeses at a count of 10^5 CFU g^{-1} . Above this limit there is an obligation to determine whether enterotoxins are present (EC regulation No 852-853/2004). It is therefore important to control *S. aureus* growth and enterotoxin production throughout the cheese making process. In most cheeses, the growth of *S. aureus* occurs mainly during the first 24 h of cheese making and the count remains stable or decreases after 30 days (Meyrand et al. 1999; Delbes et al. 2006).

During the first 24 h of cheese making, the most important factors to control *S. aureus* are pH, temperature and antagonistic microbial flora, mainly lactic acid bacteria. There are lot of data on the effect of temperature and pH on the growth of *S. aureus* (Lanciotti et al. 2001; Lindqvist et al. 2002). Sutherland et al. (1994) and McCann et al. (2003) applied the Gompertz model to predict the growth of *S. aureus* as a function of temperature, pH and NaCl concentration. By the model proposed by McCann et al. (2003), the maximum growth rate increased when temperature and pH increased, but temperature did not have a significant effect on maximum population level. These factors also affect enterotoxins production since, the pH optimal for staphylococcal enterotoxins production was between 6.5 and 7.0 (Su and Wong, 1998).

There is no model in the literature integrating antagonistic strain. Now, lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis*, *Lactococcus garvieae*, *Lactobacillus*, *Leuconostocs* and Enterococci) contribute to the control of *S. aureus* not only

by decreasing pH but also by producing bacteriocins (Villani et al. 2001; Ammor et al. 2006) or producing H₂O₂ (Ito et al., 2003). In this way, *Lactococcus garvieae* may be interesting as it is able to inhibit *S. aureus* in microfiltered milk without acidification (Alomar et al. 2007).

In the perspective to exploit the antistaphylococcal activities of *L. garvieae* in cheese production, in a first step, this study aims to determine how its concentration, temperature and pH in the range of values occurring at the beginning of cheese production affect the growth of *S. aureus*.

MATERIALS AND METHODS

Strains and media

S. aureus SA15 isolated from raw milk was grown at 37°C for 20 h in Brain Heart Infusion (BHI) (Biokar diagnostic, Pantin, France) modified by adding 12 g l⁻¹ of skimmed milk powder (Lactalis Industrie, Bourgbarré, France). *L. garvieae* N201 isolated from raw milk cheese was grown in M17 broth (Biokar) for 20 h at 30°C. Then the cultures were centrifuged at 9600 x g for 10 min at 4°C (SIGMA 3MK, Bioblock Scientific, Illkirch-France). The cell pellets were washed once in Ringer solution (Biokar) and resuspended in Ringer solution. *S. aureus* was then inoculated at 150 CFU ml⁻¹ into TPYC medium; 17 g l⁻¹ Tryptone (Biokar), 3 g l⁻¹ Peptone (Biokar), 6 g l⁻¹ Yeast extract (Biokar diagnostic, Pantin, France) and 15 g l⁻¹ Casein (PROMILK 852B, Ingredia, Arras, France) sterilized at 110°C for 10 min. The initial pH of the medium was adjusted to 5.0, 5.3, 5.6, 5.9, 6.2, 6.5 and 6.8 with 90% lactic acid (Prolabo, Lyon, France).

Table 1 Experimental matrix obtained by applying the Doehlert design methodology for three factors: concentration of *L. garvieae* N201 (N_{N201}), temperature (T°C) and pH

Combination	Coded values			Experimental values		
	N_{N201}	T°C	pH	N_{N201}	T°C	pH
C1	0.000	1.0	0.000	7.5	34	5.9
C2	0.000	+0.5	+0.866	7.5	30	6.8
C3	+0.816	+0.5	+0.289	9.0	30	6.2
C4	-0.816	+0.5	-0.289	6.0	30	5.6
C5	0.000	+0.5	-0.866	7.5	30	5.0
C6	0.000	-0.5	+0.866	7.5	22	6.8
C7	+0.816	-0.5	0.289	9.0	22	6.2
C8	-0.816	-0.5	-0.289	6.5	22	5.6
C9	0.000	-0.5	-0.866	7.5	22	5.0
C10	-0.816	0.0	0.577	6.0	26	6.5
C11	0.000	0.0	0.000	7.5	26	5.9
C12	0.816	0.0	-0.577	9.0	26	5.3
C13	0.000	-1.0	0.000	7.5	18	5.9

The pH value of the medium was determined with a 926 VTV pH meter with an Ingold 406 MX penetration electrode (Mettler-Toledo S.A., Viroflay, France) after 0, 3, 6, 9, 24 and 48 h of incubation.

Experimental design

Doehlert experimental design (Doehlert 1970) was used to determine how temperature of incubation and initial pH value affect *S. aureus* growth in co-culture with different concentration of *L. garvieae*. Doehlert uniform shell designs contain $k^2 + k + 1$ points for k variables: one at the origin, the other points on a sphere centred on the origin. Doehlert designs for three factors include three levels of one factor, five levels of another and seven levels of the third. With our three factors – concentration of *L. garvieae* N_{N201} (X_1), temperature (X_2) and pH (X_3) – a set of 13 experiments is required. The coded (X_i) and experimental values of these three factors are listed in Table 1. Thus, 12 experiments are equidistant from a central experiment having the coded values (0, 0, 0) and are distributed on a sphere with a radius of 1 (Table 1). The central point (0, 0, 0) was repeated four times.

Microbial analysis

S. aureus and *L. garvieae* were enumerated after 0, 3, 6, 9, 24 and 48 h. The samples were homogenized with a Stomacher Lab Blender (Seward Medical, London, UK) for a time optimised at 4 min to dissociate all the cell aggregates. *S. aureus* was enumerated on Rabbit Plasma Fibrinogen Agar (RPFA) (De Buyser et al. 2003) incubated for 24 at 37°C. *L. garvieae* N201 was enumerated on M17 medium (Biokar) incubated for 48 h at 30°C.

Analysis of enterotoxin production

Samples after 48 h of incubation were tested for the presence of enterotoxins (A to E) by using the Transia Plate Staphylococcal Enterotoxins (ST 0796, Diffchamb, Lyon, France). The tests were performed by the Laboratoire Interprofessionnel d'Analyses Laitières (LIAL)-Massif Central (Aurillac, France) as recommended by the manufacturer. This kit has a detection limit of ca 0.1 ng g⁻¹. When enterotoxins were detected in a culture after 48 h, they were analysed on all samples taken at earlier times.

Statistical analysis and interpretation of the results

Multiple regression analysis based on the least square method was performed using StatSoft Statistica software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) to analyse *S. aureus* growth data obtained in different conditions of the experimental design. The linear and quadratic effects of the three factors (concentration of *L. garvieae*, temperature of incubation and pH) and their interactions were analysed. The significance of the coefficients was evaluated by Fischer Test (F) with unequal variances ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$).

RESULTS AND DISCUSSION

Factors affecting *S. aureus* SA15 growth

Factors affecting (coefficient and significant) level of *S. aureus* growth in co-culture with *L. garvieae* inferred from the experimental design are shown in table 2. The regression coefficient (R^2) upper than 0.97% after 6 h of incubation indicated that the polynomial model give a good prediction of *S. aureus* between 6 and 48 h of incubation. It was less significant during the first 3 hours ($R^2 = 0.89\%$).

Table 2 Regression coefficients obtained for influence of temperature, pH and concentration of *L. garvieae* N201 on *S. aureus* SA15 growth at 3, 6, 9, 24 and 48 h

Mean	Coefficient	3 h	6 h	9 h	24 h	48 h
	b ₀	+0.250*	+0.398***	+0.649***	+1.892***	+4.708***
Linear						
N _{N201}	b ₁	-0.376**	-0.431***	-0.380**	-0.492**	-0.776**
T	b ₂	+0.269*	+0.502***	+0.696***	+2.142***	+2.554***
pH	b ₃	-0.106 ^{NS}	+0.105 ^{NS}	+0.200*	+1.479***	+2.049***
Quadratic						
N _{N201} ²	b ₁₁	+0.237 ^{NS}	+0.425**	+0.452**	+0.570*	-0.497 ^{NS}
T ²	b ₂₂	-0.0364	+0.043 ^{NS}	-0.077 ^{NS}	+0.248 ^{NS}	-2.133***
pH ²	b ₃₃	-0.361*	-0.465**	-0.506**	-0.993**	-3.228***
Interaction						
N _{N201} .T	b ₁₂	-0.425 ^{NS}	+0.099 ^{NS}	-0.320 ^{NS}	+0.300 ^{NS}	-0.456 ^{NS}
N _{N201} .pH	b ₁₃	-0.112 ^{NS}	+0.341*	+0.513*	+0.480 ^{NS}	+0.246 ^{NS}
T.pH	b ₂₃	+0.053 ^{NS}	+0.246 ^{NS}	+0.212 ^{NS}	+2.164***	+2.692***
R ²		0.89	0.97	0.97	0.99	0.99

NS not significant, * Significant (0.01 < P < 0.05), ** Very significant (0.001 <

P < 0.01), *** Highly significant (P < 0.001).

The initial concentration of *L. garvieae* had the highest significant negative effect on *S. aureus* growth. It was very significant at 6 h ($P < 0.001$). This negative effect in linear terms reinforced by the positive quadratic term until 24 h of incubation suggests stronger inhibition of *S. aureus* when the initial concentration of *L. garvieae* was higher (table 2).

Temperature was the most important factor influencing *S. aureus* growth throughout the incubation ($P < 0.001$). Indeed the positive linear term, was always highly significant, the effect was modulated by the significant negative quadratic term at 48 h of incubation. There was no interaction between the temperature and the concentration of *L. garvieae* whatever the incubation time. A positive combined effect of temperature and pH was observed only after 24 h and 48 h of incubation.

The initial pH value had no significant linear effect until 9 h of incubation. This positive linear effect modulated by the negative quadratic term on *S. aureus* growth in co-culture with *L. garvieae* was highly significant only at 24 and 48 h (table 2). This result suggests that may be important to control pH value mainly after 9 h of manufacturing even after the addition of antagonistic strain in milk. Such advice was also suggested by the results of Delbes et al. (2006) showing a relation between levels of *S. aureus* at 24 h and pH value of cheese at 6 h of manufacturing.

The growth of *S. aureus* described by a second degree polynomial model can be written by the following equation:

$$\text{Level of } S. \text{ aureus growth (log}_{10} \text{ CFU ml}^{-1}) = b_0 + b_1 \cdot [\text{N201}] + b_2 \cdot (\text{TC}) + b_3 \cdot (\text{pH}) + b_{11} \cdot [\text{N201}]^2 + b_{22} \cdot (\text{TC})^2 + b_{33} \cdot (\text{pH})^2 + b_{12} \cdot [\text{N201}] \cdot (\text{TC}) + b_{13} \cdot [\text{N201}] \cdot (\text{pH}) + b_{23} \cdot (\text{TC}) \cdot (\text{pH}).$$

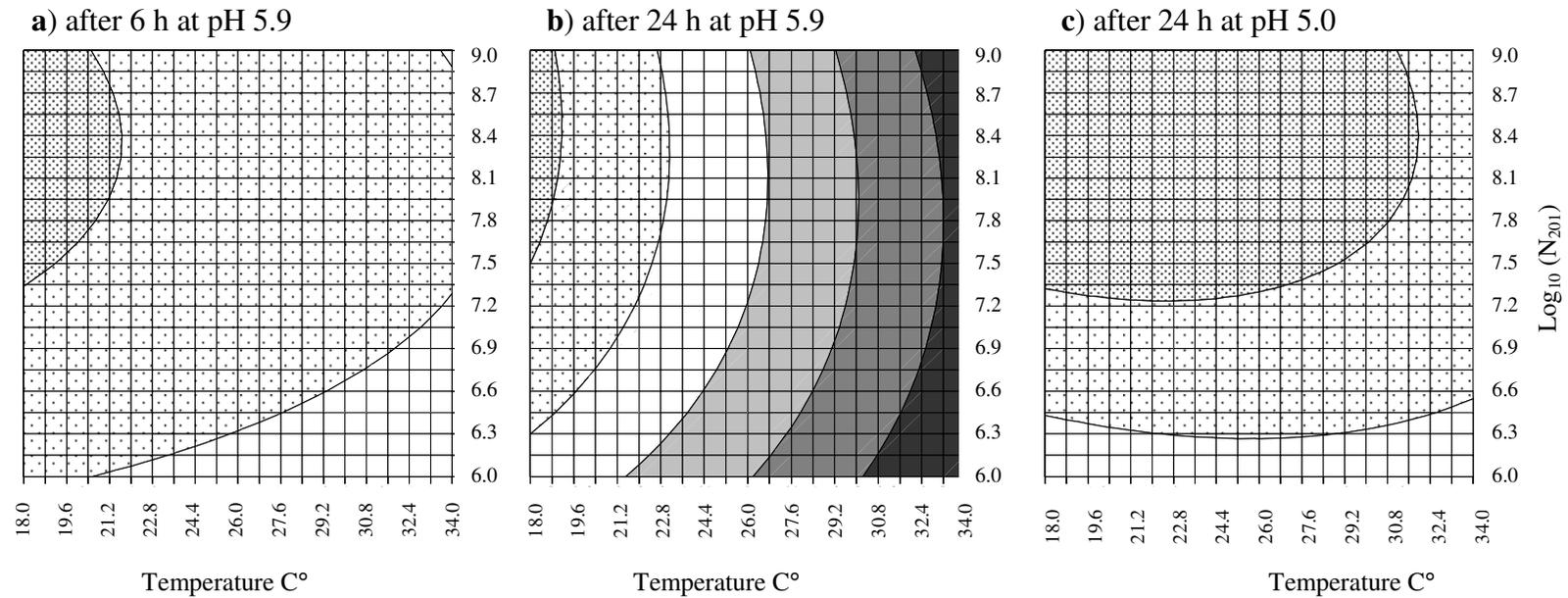


Fig. 1 Surface response **a)** after 6 h at pH 5.9; **b)** after 24 h at pH 5.9 and **c)** after 24 h of incubation at pH 5.0, at different temperatures and initial concentrations of *L. garvieae* N201.

$\Delta \log S. aureus$ counts = $\log N_{(6 \text{ or } 24)} - \log N_0$. (N_6 = counts at 6 h; N_{24} = counts at 24 h, N_0 = counts at 0 h): () $\Delta = -1$ to 0, ()

$\Delta = 0$ to 1, () $\Delta = 1$ to 2, () $\Delta = 2$ to 3, () $\Delta = 3$ to 4, () $\Delta = 4$ to 5.

The values of the coefficient at different times of incubation are indicated in table 2.

The response surface shows the influence of temperature and initial concentration of *L. garvieae* on the growth of *S. aureus* at different pH values.

After 6 h of incubation at an initial pH of 5.9 (Fig. 1a) and a temperature of 22°C, *S. aureus* did not grow when *L. garvieae* was at concentration 7.8 log₁₀ CFU ml⁻¹. This may argue for favouring this species in cheese making as these conditions of temperature and pH were encountered at the beginning of the cheese process. At an initial concentration of *L. garvieae* greater than 7.35 log₁₀ CFU ml⁻¹, the growth of *S. aureus* was not influenced by temperatures between 22°C and 34°C whereas at lower concentrations it increased with increasing temperature. Then *L. garvieae* can limit the positive effect of temperature on *S. aureus* growth.

After 24 h of incubation at pH 5.9 (Fig. 1b), the effect of *L. garvieae* on *S. aureus* growth was less effective. At 20°C, *S. aureus* did not grow if the initial concentration of *L. garvieae* was above 6.5 log₁₀ CFU ml⁻¹. Higher temperatures favoured the growth of *S. aureus*, so that at 33°C at pH 5.9 *L. garvieae* had no inhibitory effect whatever its concentration.

At pH 5.0 after 24 h of incubation, the increase of *L. garvieae* concentration reduce the growth of *S. aureus* at temperature below 30°C, but it had no effect at higher temperatures (Fig. 1c). Fortunately during pressed uncooked cheese making, when pH value was 5.9 generally after 6 h of fabrication (Delbes et al. 2006) the temperature was under 24°C. Our results may explain why *S. aureus* stop growing after 24 h in this kind of cheese (Delbes et al.

2006) when the pH reach 5.2 and the temperature decrease under 20°C. The addition of *L. garvieae* may help to control *S. aureus* at the beginning of the process as the inhibition in medium was the most effective before 6 h of incubation when the pH was 6.8 and the temperature was 34°C.

Enterotoxins production by *S. aureus*

Staphylococcal enterotoxins were detected only after 48 h of incubation at 30°C with an initial pH of 6.8 and an initial *L. garvieae* N201 concentration of $7.5 \log_{10}$ CFU ml⁻¹. Staphylococcal enterotoxins were never detected after 3, 6, 9 or 24 h, under these or any other conditions. These results are in agreement with these obtained in uncooked pressed cheese showing that staphylococcal enterotoxins were detected in cheeses showing a pH higher than 6.5 at 6 h (Delbes et al. 2006). They argue to control *S. aureus* at the beginning of the cheese making process when the conditions of pH and temperature may favour enterotoxins production.

Our results suggest that growth model form must take intoaccount the interaction with other microbial populations.

Further studies, will be performed in cheeses to check the combined effect of temperature, pH value and concentration of *L. garvieae* on *S. aureus* growth.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Jean Bernard Millière for his helpful advices and Harriet Coleman for English proof reading.

REFERENCES

- Alomar, J., Loubiere, P., Delbes, C., Nouaille, S., and Montel, M. C. (2007) Effect of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Revision Food Microbiology*.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., and Chevallier, I. (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1--Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* **17**, 454 - 461.
- De Buyser, B. Lombard, M.L., Schulten, S.M., Veld, P.H. int., Scotter, S. L., Rollier, P. and Labellec, C. (2003) Validation of EN ISO Standard methods 6888 part 1 and 2: 1999- enumeration of coagulase-positive Staphylococci in food. *Int J Food Microbiol* **83**: 185 – 194.
- Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F. and Montel, M.C. (2006) *Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin Production during Manufacture of Non-Cooked, Semi-Hard Cheese from Cow's Raw Milk . *J Food Prot* **69**, 2161 - 2167.
- Doehlert, D. H. (1970) Uniform Shell Designs. *Appl Stat* **19**, 231 - 239.
- Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., and Toba, T. (2003). The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. *Current Microbiol* **47** , 231–236.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Vannini, L., and Guerzoni, M. E. (2001) Growth/no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus*

aureus and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. *Food Microbiol* **18**, 659 - 668.

Lindqvist, R.; Sylven, S., and Vagsholm, I. (2002) Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *Int J Food Microbiol* **78**,155-170.

McCann, T. L., Eifert, J. D., Gennings, C., Schilling, M. W., and Carter, Jr. W. H. (2003) A predictive model with repeated measures analysis of *Staphylococcus aureus* growth data. *Food Microbiol* **20**, 139 -147.

Meyrand, A., Vernozy-Rozand, C., Lapeyre, C. and Richard, Y. (1999) Main differences in behavior and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in two different raw milk cheeses. *Revue Méd. Vét* **150**, 271 - 278.

Simeao do Carmo, L., Dias, R. Souza, Linardi, and Heneine, L. G. (2002) Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol* **19**, 9 -14.

Su, Y.-C. and Wong, A. C. L. (1998) Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. *Int J Food Microbiol* **39**, 87 -91.

Sutherland, J. P., Bayliss, A.J. and Roberts, T.A. (1994) Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *Int J Food Microbiol* **21**, 217 - 236.

Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. and Moschetti, G. (2001) Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *J Appl Microbiol* **90**, 430 – 439.

CHAPITRE 4

Rôle du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans l'inhibition de *S. aureus* par les *Lactococcus*. Etude de l'interaction *S. aureus* SA15 – *L. garvieae* N201.

Tableau 24: Niveaux (logN) des souches de *S. aureus* d'origine diverse inoculées en milieu BHI tamponné à pH 6,8 avec différentes concentrations d'H₂O₂ (0, 1, 2, 3 et 4 mmol/l). Les cultures ont été incubées sans agitation à 30°C et 24°C.

		Niveaux des souches de <i>S. aureus</i> (logN)											
Temps	Concentration d'H ₂ O ₂ mmol/l	SA15*		ps 87		ps 219		ps 332		ps 325		ps 196	
		30°C	24°C	30°C	24°C	30°C	24°C	30°C	24°C	30°C	24°C	30°C	24°C
0 h	0	3,15	3,24	3,24	3,24	3,42	3,42	3,65	3,65	3,56	3,56	3,25	3,25
3 h	0	3,85	3,74	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1	2,76	1,71	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	2,50	1,53	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	3	<10±0,00	<10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	<10	<10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6 h	0	4,88	4,15	4,15	3,84	4,71	4,03	4,60	4,10	5,03	4,65	4,30	4,01
	1	3,64	1,36	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	1,75	1,09	<10	<10	1,16	<10	1,54	<10	<10	<10	<10	<10
	3	<10	<10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	<10	<10	0,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
24 h	0	8,05	7,39	6,85	5,30	7,70	6,90	8,61	7,00	8,46	7,90	6,00	5,36
	1	7,79	2,72	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2	5,34	0,59	<10	<10	5,30	<10	6,30	<10	<10	<10	<10	<10
	3	3,59	<10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

ND= non déterminé

*Les niveaux de *S. aureus* SA15 sont la moyenne de deux répétitions; un seul essai pour les autres souches.

Chapitre 4: Rôle du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans l'inhibition de *S. aureus* par les *Lactococcus*. Etude de l'interaction *S. aureus* SA15 – *L. garvieae* N201.

4.1. Objectif

Les résultats présentés dans le chapitre 2 n'ont pas permis d'identifier la nature de l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*, qui ne serait due ni à la diminution du pH, ni à la production de bactériocines. Les résultats du chapitre 3 ont précisé l'effet de la température et du pH sur l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*. Sur la base de ces résultats du chapitre 2 et de la bibliographie, nous avons émis l'hypothèse que le peroxyde d'hydrogène pourrait être impliqué dans l'inhibition.

L'objectif du chapitre 4 était donc:

- 1- de vérifier le rôle éventuel de l'H₂O₂ dans l'inhibition de *S. aureus*,
- 2- d'étudier plus particulièrement le rôle de l'H₂O₂ dans l'interaction de la souche *S. aureus* SA15 avec la souche *L. garvieae* N201.

4.2. Résultats

4.2.1. Sensibilité de différentes souches de *S. aureus* à l'H₂O₂

L'effet de différentes concentrations d'H₂O₂ (0, 1, 2, 3 et 4 mmol/l) sur les niveaux des souches de *S. aureus* à 24 et 30°C est présenté dans le tableau 24. Quelle que soit la température d'incubation 24 ou 30°C, aucune des 6 souches testées n'est cultivable sur milieu gélosé RPFa après 3, 6 et 24 h d'incubation en milieu BHI contenant 4 mmol/l d'H₂O₂. Cette perte de cultivabilité pour toutes les souches est aussi observée à 24°C dans le milieu BHI avec 2 mmol/l d'H₂O₂. A 30°C, la sensibilité des souches à 2 mmol/l d'H₂O₂ est variable d'une souche à l'autre. Trois souches (ps325, ps196 et ps87) ne sont plus cultivables sur milieu RPFa après 6 et 24 h de culture en BHI avec 2 mmol/l d'H₂O₂. En revanche, les niveaux des souches SA15, ps219 et ps332 diminuent à 6 h d'incubation d'environ 2,5 log₁₀ ufc/ml par rapport à leur niveau initial mais augmentent entre 6 et 24 h de 3,5 à 4,7 log₁₀ ufc/ml selon les souches. La croissance de la souche *S. aureus* SA15, sélectionnée comme souche cible dans cette thèse n'est pas sensible à une concentration de 1 mmol/l d'H₂O₂ à 30°C. En revanche, à 24°C son niveau de population est inférieur de 5 log₁₀ ufc/ml à celui atteint dans un

Tableau 25: Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) par des souches de *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* et *Lactococcus garvieae* dans un milieu BHI tamponné à pH 6,8 à 30°C sans agitation.

Espèces	Souches	Concentration d'H ₂ O ₂ mmol/l à			Niveau de BL log ₁₀ ufc/ml		
		0 h	9 h	24 h	0	9 h	24 h
<i>L. lactis</i>	N658	0,00	2,23	0,00	8,01	8,86	9,58
	N650	0,00	0,00	0,00	7,73	8,54	8,86
	N688	0,00	0,00	0,00	8,30	9,22	10,18
<i>E. faecalis</i>	N516	0,00	0,00	0,00	7,71	9,33	9,19
<i>L. garvieae</i>	N201	0,00	3,17	2,01	7,76	9,45	9,15
	Tan1	0,00	3,10	1,9	7,93	10,18	9,13
	Tan2	0,00	0,00	0,00	7,60	8,92	9,12
	1204	0,00	0,00	0,00	7,65	9,52	9,53

BL= bactérie lactique

Tableau 26 : Effet de l'agitation sur la concentration d'H₂O₂ et le niveau de *L. garvieae* en milieu BHI tamponné à pH 6,8 et incubé à 30°C.

Temps (h)	Concentration d'H ₂ O ₂ mmol/l		Dénombrement de <i>L. garvieae</i> N201 log ₁₀ ufc/ml	
	Statique	Agitation	Statique	Agitation
0	0,0 ± 0,00 ^{NS}	0,0 ± 0,00 ^{NS}	7,62 ± 0,12 ^{NS}	7,62 ± 0,12 ^{NS}
3	1,68 ± 0,29 ^{NS}	1,54 ± 0,17 ^{NS}	8,44 ± 0,41 ^{NS}	8,21 ± 0,09 ^{NS}
6	2,48 ± 0,23 ^{NS}	1,97 ± 0,31 ^{NS}	9,77 ± 0,46 ^{a*}	8,62 ± 0,07 ^{b*}
9	3,17 ± 0,33 ^{NS}	2,70 ± 0,54 ^{NS}	9,72 ± 0,79 ^{NS}	8,57 ± 0,20 ^{NS}
24	2,01 ± 0,39 ^{NS}	1,61 ± 0,13 ^{NS}	8,87 ± 0,24 ^{NS}	8,81 ± 0,15 ^{NS}

Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. NS= non significatif, * = p< 0,05.

Dans la même ligne, les lettres a et b indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a>b). Les moyennes dans une même ligne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls.

milieu sans H₂O₂. A 3 mmol/l d'H₂O₂, la souche *S. aureus* SA15 n'est plus cultivable sur le milieu RPPA après 6 h d'incubation à 30 et 24°C mais elle retrouve sa cultivabilité après 24 h d'incubation en milieu BHI uniquement à 30°C.

La plus grande sensibilité à l'H₂O₂ de la souche de SA15 à 24°C qu'à 30°C pourrait s'expliquer par une activité catalasique de *S. aureus* plus forte à 30°C qu'à 24°C ce qui sera vérifié.

4.2.2. Production d'H₂O₂ par les souches de bactérie lactique (*Lactococcus*, *Enterococcus*).

Le peroxyde d'hydrogène n'a pas pu être dosé en lait, en milieu M17 ou en milieu TPYC, seul le milieu BHI permet un dosage. Cependant, une interaction du BHI dans la mesure de l'H₂O₂ a été mise en évidence lors de la réalisation des gammes étalons.

La production d'H₂O₂ par les différentes souches de *L. lactis*, *L. garvieae* et *E. faecalis* étudiées dans le chapitre 2 est présentée dans le tableau 25.

Après 9 h d'incubation en milieu BHI tamponné à pH 6,8 et incubé à 30°C sans agitation, seules la souche *L. lactis* N658 et les deux souches de *L. garvieae* Tan1 et N201 sont capables de produire de l'H₂O₂ entre 2 et 3 mmol/l. Entre 9 et 24 h d'incubation, la concentration d'H₂O₂ diminue et à 24 h celui-ci n'est détecté que dans les cultures contenant *L. garvieae*.

Cependant, il est difficile de conclure sur l'absence de production d'H₂O₂ par les autres souches sans une mesure à d'autres temps de croissance.

Suite aux remarques des "reviewers" sur l'article présenté dans le chapitre 2, la production d'H₂O₂ sera intégrée dans l'article en révision pour Food Microbiology.

L'effet de l'agitation du milieu sur la production d'H₂O₂ par *L. garvieae* N201 est résumé dans le tableau 26. Aux différents temps d'incubation 3, 6, 9 et 24 h à 30°C, la production d'H₂O₂ est similaire que le milieu soit agité ou non. Cependant, le niveau de *L. garvieae* est significativement plus faible à 6 h en milieu agité, ce qui semble entraîner une plus faible production d'H₂O₂ par rapport à un milieu non agité. Les résultats divergent par rapport à ceux de la littérature. En effet, Batdorj et al. (2007) ont montré que *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* produisait plus d'H₂O₂ en condition agitée que non agitée. Nos résultats confirment ceux d'Otero et al. (2006) qui montraient que l'agitation n'a pas un effet significatif sur la concentration d'H₂O₂ produit par *Lactobacillus gasserii* mais avec une tendance à produire plus d'H₂O₂ en milieu agité.

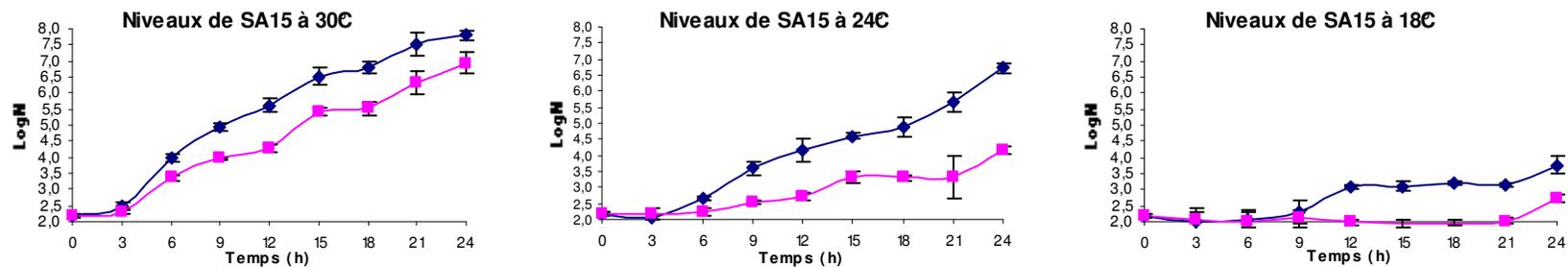


Figure 9: Evolution de *S. aureus* SA15 en fonction du temps d'incubation à 30°C, 24°C et 18°C dans un milieu BHI tamponné à pH 6,8.

◆ culture seule; ■ co-culture avec *L. garvieae* N201.

Tableau 27: Croissance de *S. aureus* SA15 en culture seule ou en co-culture avec *L. garvieae* N201 à 30, 24 et 18°C. L'inhibition est exprimée en $\Delta = \text{Log} [S. aureus \text{ en culture seule}] - \text{Log} [S. aureus \text{ en co-culture avec } L. garvieae \text{ N201}]$.

Culture	Température d'incubation (C°)	Niveaux de <i>S. aureus</i> SA15 en culture seule ou en co-culture avec <i>L. garvieae</i> N201 à								
		0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	15 h	18 h	21 h	24 h
SA15	30	2,16 ± 0,05 ^{NS}	2,50 ± 0,07 ^{NS}	3,99 ± 0,11 ^{a*}	4,93 ± 0,11 ^{a*}	5,61 ± 0,21 ^{a*}	6,35 ± 0,50 ^{a*}	6,80 ± 0,15 ^{a*}	7,53 ± 0,37 ^{a*}	7,81 ± 0,15 ^{a*}
SA15+N201	30	2,16 ± 0,05 ^{NS}	2,30 ± 0,05 ^{NS}	3,35 ± 0,10 ^{b*}	3,95 ± 0,02 ^{b*}	4,35 ± 0,25 ^{b*}	5,44 ± 0,13 ^{b*}	5,52 ± 0,21 ^{b*}	5,97 ± 0,21 ^{b*}	6,94 ± 0,34 ^{b*}
Δ		0	0,2	0,64	0,98	1,26	0,91	1,28	1,56	0,87
SA15	24	2,28 ± 0,09 ^{NS}	2,06 ± 0,06 ^{NS}	2,65 ± 0,04 ^{a*}	3,59 ± 0,21 ^{a*}	4,16 ± 0,37 ^{a*}	4,59 ± 0,10 ^{a*}	4,89 ± 0,30 ^{a*}	5,66 ± 0,32 ^{a*}	6,73 ± 0,15 ^{a*}
SA15+N201	24	2,20 ± 0,07 ^{NS}	2,19 ± 0,17 ^{NS}	2,25 ± 0,13 ^{b*}	2,52 ± 0,06 ^{b*}	2,73 ± 0,14 ^{b*}	3,34 ± 0,18 ^{b*}	3,49 ± 0,32 ^{b*}	3,01 ± 1,02 ^{b*}	4,14 ± 0,13 ^{b*}
Δ		0,08	-0,13	0,4	1,07	1,43	1,25	1,4	2,65	2,59
SA15	18	2,16 ± 0,08 ^{NS}	2,02 ± 0,26 ^{NS}	2,07 ± 0,26 ^{NS}	2,28 ± 0,35 ^{NS}	3,08 ± 0,06 ^{a*}	3,10 ± 0,15 ^{a*}	3,18 ± 0,06 ^{a*}	3,14 ± 0,07 ^{a*}	3,75 ± 0,27 ^{a*}
SA15+ N201	18	2,22 ± 0,12 ^{NS}	2,06 ± 0,34 ^{NS}	1,99 ± 0,35 ^{NS}	2,11 ± 0,27 ^{NS}	1,98 ± 0,09 ^{b*}	1,93 ± 0,10 ^{b*}	1,97 ± 0,10 ^{b*}	2,02 ± 0,07 ^{b*}	2,72 ± 0,10 ^{b*}
Δ		-0,06	-0,04	0,08	0,17	1,1	1,17	1,21	1,12	1,03

Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. NS= non significatif, * = p< 0,05. Dans la même colonne à chaque température d'incubation (30°C, 24°C, 18°C) les lettres a et b indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a>b). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls.

4.2.3. Rôle de l'H₂O₂ dans l'interaction *S. aureus* SA15 et *L. garvieae* N201

4.2.3.1. Croissance de *S. aureus*

Sur la base des résultats des paragraphes 4.2.1 et 4.2.2, nous avons choisi d'étudier plus spécifiquement l'interaction entre la souche *S. aureus* SA15 (sensibilité à l'H₂O₂ dépendante de la température) et *L. garvieae* N201 (plus forte production d'H₂O₂ dans nos conditions de test). Les courbes de croissance de *S. aureus* SA15 en présence ou non de *L. garvieae* à différentes températures sont données dans la figure 9. L'inhibition est présentée dans le tableau 27.

A 24 et 30°C, *S. aureus* est inhibé par *L. garvieae* à partir de 6 h d'incubation, ce qui correspond au début de sa phase de croissance en absence de *L. garvieae*.

A partir de 21 h de incubation, l'inhibition (exprimée en Δ log de niveau de *S. aureus* avec et sans *L. garvieae*) de la croissance est plus forte à 24°C qu'à 30°C. En effet à 24°C, elle augmente au cours du temps alors qu'elle reste stable à 30°C.

La croissance de *S. aureus* SA15 à 18°C en absence de *L. garvieae* démarre à 12 h d'incubation mais l'accroissement de population n'est que de 1,6 log à 24 h alors que elle est de 5,6 log à 30°C. Pendant toute la durée d'incubation à 18°C, aucune croissance de *S. aureus* n'est observée en présence de *L. garvieae* N201. *L. garvieae* en combinaison avec la température d'incubation inhiberait la croissance de *S. aureus*.

4.2.3.2. Croissance de *Lactococcus garvieae*

Les courbes de croissance de *L. garvieae* N201 seule ou en co-culture avec *S. aureus* SA15 sont présentées dans la figure 10.

Quelle que soit la température d'incubation, la croissance de *L. garvieae* est similaire en culture seule ou en co-culture avec *S. aureus* SA15. Les niveaux maximaux de population sont similaires à 30 et 24°C et sont atteints dès 9 h d'incubation. A 18°C, la population maximale, de niveau similaire à celui obtenu à 30 et 24°C, est atteinte beaucoup plus tardivement après 21 h d'incubation.

A 30 et 24°C, la population diminue après 9 h d'incubation surtout dans les milieux sans *S. aureus*. Il y a une tendance à la diminution à 30°C, mais pas à 24°C.

4.2.3.3. Production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

La production d'H₂O₂ dans les surnageants de culture est présentée dans la figure 11.

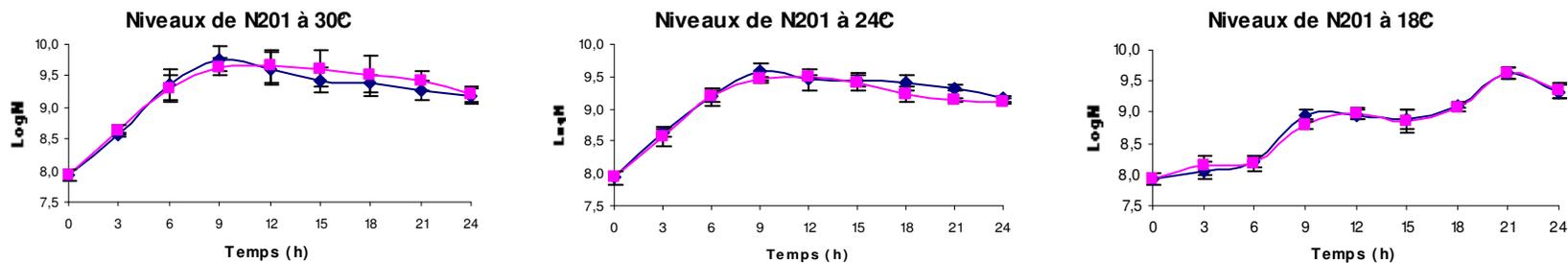


Figure 10: Evolution de *L. garvieae* N201 (logN) en fonction du temps d'incubation à 30°C, 24°C et 18°C dans un milieu BHI tamponné à pH 6,8. ◆ culture seule; ■ co-culture avec *S. aureus* SA15.

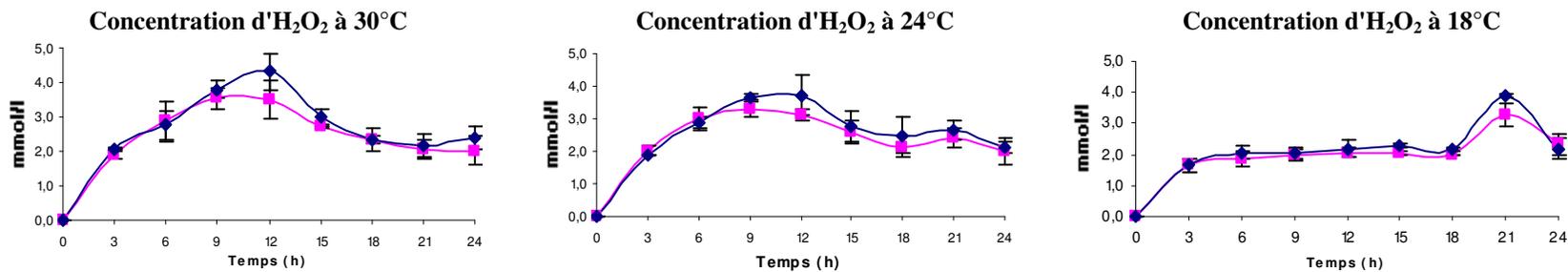


Figure 11: Production d'H₂O₂ (mmol/l) en fonction du temps d'incubation à 30°C, 24°C et 18°C dans des surnageants de culture de *L. garvieae* N201 en milieu BHI tamponné à pH 6,8. ◆ culture seule ■ co-culture avec *S. aureus* SA15.

A 30 ou 24°C avec ou sans *S. aureus*, la production d'H₂O₂ dans les surnageants de *L. garvieae* est similaire. Elle est maximale après 12 h d'incubation et tend à décroître ensuite. Cependant à 12 h d'incubation, elle est légèrement supérieure dans les milieux sans *S. aureus* et elle est plus importante à 30°C qu'à 24°C.

A 18°C, la concentration d'H₂O₂ est maximale aux environs de 21 h de croissance dans une culture de *L. garvieae* seule, elle est significativement plus faible dans les surnageants de culture de *L. garvieae* avec *S. aureus*. Aux autres temps d'incubation, aucune différence significative de production n'est observée dans des surnageants de culture avec ou sans *S. aureus*.

Aucune production d'H₂O₂ n'est notée dans les milieux uniquement inoculés avec *S. aureus* SA15 (résultats non montrés).

Quelle que soit la température d'incubation, la production d'H₂O₂ est maximale au temps où le niveau de *L. garvieae* est maximal.

Compte tenu des résultats obtenus sur la sensibilité des souches de *S. aureus*, il semblerait que les quantités d'H₂O₂ produites puissent inhiber *S. aureus* SA15.

4.2.3.4. Levée d'inhibition par ajout de catalase

Comme indiqué dans le tableau 28, à 30°C l'addition de 2000 et 4000 IU/ml de catalase lève l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* dès 6 h d'incubation. Aucune inhibition n'est notée après 24 h d'incubation quelle que soit la concentration de catalase ajoutée. A 24°C, l'inhibition n'est que partiellement levée par addition de catalase même à 4000 IU/ml après 24 h d'incubation. La croissance est d'autant plus importante que la concentration de catalase est forte.

Ces résultats arguent pour un rôle de l'H₂O₂ dans l'inhibition. Malgré les difficultés techniques, il conviendrait de vérifier quelle quantité d'H₂O₂ résiduelle reste dans le milieu à 24°C.

Afin de vérifier si la moindre levée d'inhibition à 24°C est due à une plus faible activité catalasique à cette température qu'à 30°C, nous avons évalué l'activité catalasique de *S. aureus* SA15 à différentes températures. L'activité catalasique de cellules « en repos » pré cultivées à 30°C est identique (voisine de 40 μmol H₂O₂/min pour 10⁷ ufc/ml de SA15) à 30°C, 24°C et 18°C dans nos conditions expérimentales.

La moindre levée d'inhibition à 24°C ne semblerait pas être due à une plus faible activité catalasique.

Tableau 28: Niveau de *S. aureus* SA15 en BHI tamponné à pH 6,8 en culture seule ou en co-culture avec *L. garvieae* N201 avec ou sans addition de catalase. La catalase a été ajoutée à la co-culture de *S. aureus* SA15 avec *L. garvieae* N201 à concentration (0, 500, 1000, 2000 et 4000 IU/ml).

Culture	Catalase IU/ml	Niveau de <i>S. aureus</i> SA15 (log ₁₀ ufc/ml)					Niveau de <i>S. aureus</i> SA15 (log ₁₀ ufc/ml)			
		0h	Incubation à 30°C				Incubation à 24°C			
			3h	6h	9h	24h	3h	6h	9h	24h
SA15	0	2,54±0,12	3,18±0,16 ^{ns}	4,15±0,03 ^{a*}	5,32±0,30 ^{a*}	8,01±0,24 ^{a*}	2,42±0,11 ^{ns}	3,02±0,21 ^{ns}	3,60±0,25 ^{ns}	6,69±0,04 ^{a*}
SA15+N201	0	2,57±0,16	2,74±0,26 ^{ns}	3,63±0,13 ^{b*}	4,35±0,29 ^{b*}	7,17±0,19 ^{b*}	2,31±0,07 ^{ns}	2,81±0,07 ^{ns}	3,23±0,20 ^{ns}	4,51±0,07 ^{e*}
SA15+N201	500	2,45±0,15	2,96±0,12 ^{ns}	3,99±0,26 ^{ab*}	4,89±0,25 ^{ab*}	7,61±0,16 ^{a*}	2,46±0,03 ^{ns}	2,90±0,05 ^{ns}	3,47±0,07 ^{ns}	5,16±0,22 ^{d*}
SA15+N201	1000	2,36±0,18	3,04±0,17 ^{ns}	4,00±0,26 ^{ab*}	4,91±0,25 ^{ab*}	7,86±0,22 ^{a*}	2,53±0,04 ^{ns}	3,04±0,17 ^{ns}	3,41±0,08 ^{ns}	5,53±0,01 ^{c*}
SA15+N201	2000	2,44±0,18	3,12±0,11 ^{ns}	4,12±0,18 ^{a*}	5,21±0,29 ^{a*}	7,88±0,25 ^{a*}	2,47±0,05 ^{ns}	3,07±0,12 ^{ns}	3,64±0,18 ^{ns}	5,67±0,06 ^{bc*}
SA15+N201	4000	2,39±0,21	3,11±0,20 ^{ns}	4,17±0,11 ^{a*}	5,24±0,29 ^{a*}	7,96±0,29 ^{a*}	2,48±0,07 ^{ns}	3,08±0,12 ^{ns}	3,62±0,21 ^{ns}	5,84±0,15 ^{b*}

Les résultats sont la moyenne de trois répétitions. NS= non significatif, * = p< 0,05. Dans la même colonne à chaque température d'incubation (30°C, 24°C) les lettres a, b, c, d et e indiquent des groupes statistiques homogènes. Les nombres associés aux différentes lettres ne sont pas équivalents (a>b>c>d>e). Les moyennes dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes selon le test statistique de Newman-Keuls.

Tableau 29: Activité catalasique (µmol H₂O₂/min pour 10⁷ ufc/ml de SA15) de cellules de *S. aureus* SA15 pré-cultivées à 30, 24 et 18°C en culture seule ou en co-culture avec *L. garvieae* N201.

Temps (h)	Incubation à 30°C		Incubation à 24°C		Incubation à 18°C	
	SA15	SA15+N201	SA15	SA15+N201	SA15	SA15+N201
0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
3	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
6	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
9	1,43±0,10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
12	2,12±0,10	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
15	3,86±0,35	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00	0,00	0,00
18	29,83±5,76	0,00±0,00	2,05±0,97	0,00	0,00	0,00
21	59,79±12,30	5,58±1,73	5,17±0,33	0,00	0,00	0,00
24	36,37±6,68	25,00±3,26	7,87±1,46	0,00	0,00	0,00

Les résultats sont la moyenne de trois répétitions.

Elle pourrait aussi être due à une plus forte production d'H₂O₂ à 24°C que nous n'aurions pas mis en évidence.

4.2.3.5. Synthèse de catalase par *S. aureus*

L'activité catalasique de cellules de *S. aureus* SA15 précultivées à 30, 24 et 18°C en culture seule ou en co-culture avec *L. garvieae* est présentée dans le tableau 29. Aucune activité catalasique n'est dosée dans les cellules de *S. aureus* cultivées à 18°C en présence ou non de *L. garvieae* N201. L'activité catalasique de cellules cultivées à 24°C n'est dosée qu'après 18 h de croissance et uniquement dans des cellules cultivées sans *L. garvieae*. La plus forte activité catalasique est dosée avec des cellules de *S. aureus* cultivées en culture seule à 30°C. Elle augmente avec l'âge des cellules jusqu'à 21 h de croissance, mais les cellules à 24 h de culture ont une activité plus faible. Quelle que soit l'âge des cultures, elle est plus faible dans des cellules issues de co-culture avec *L. garvieae*.

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces résultats. Dans la première hypothèse, les plus fortes activités catalasiques seraient associées à une plus forte densité cellulaire même si les cellules ont été théoriquement ajustées à la même densité de cellules. Le dosage d'activité catalasique nécessite une densité cellulaire voisine de 10⁷ ufc/ml. L'activité n'est pas dosable à des niveaux cellulaires inférieurs à 10⁶ ufc/ml.

L'étude des interactions devrait être menée dans de petits réacteurs à membranes pour séparer les cellules de *S. aureus* et de *L. garvieae* et ainsi mieux quantifier les deux populations.

Une plus forte synthèse de catalase à 30°C qu'à 24°C ou 18°C peut être avancée comme deuxième hypothèse.

La troisième hypothèse attribuerait ces différences à une interférence de l'H₂O₂ dans le dosage de la catalase.

4.3. Discussion-conclusion

Nos résultats permettent de conclure que le peroxyde d'hydrogène est impliqué dans l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*. En effet, la souche *S. aureus* SA15 est sensible à une concentration de 2 mmol/l d'H₂O₂, quantité qui peut être produite par la souche de *L. garvieae* N201 en milieu BHI tamponné à pH 6,8. La quantité maximale

d'H₂O₂ correspond à la phase de croissance de la souche et ne serait pas affectée par l'agitation du milieu à 150 rpm. Certaines souches de *L. lactis* pourraient également inhiber par production d'H₂O₂. Les résultats confirment ceux de la littérature qui décrivent une sensibilité de *S. aureus* à des concentrations de 3 à 4 mmol/l d'H₂O₂ (Ocana et al., 1999; Otero et al., 2006). Batdorj et al. (2007) ont montré que *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* ne produisait de l'H₂O₂ (5 mmol/l) que lorsque le milieu est agité. Les travaux d'Otero et al. (2006) indiquent que la production d'H₂O₂ par *Lactobacillus gasseri* est identique en culture agitée et non agitée.

Notre étude a permis de préciser les potentialités antagonistes de *L. garvieae* en identifiant l'H₂O₂ comme molécule inhibitrice. Dans la littérature, celles-ci sont attribuées à la production de bactériocine, garviecine L1-5 décrite par Villani et al. (2001). Ammor et al. (2006) n'ont pas identifié les molécules responsables de l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* en milieu gélosé. Il pourrait s'agir du peroxyde d'hydrogène, qui n'avait pas été dosé dans cette étude.

Nos résultats interrogent sur le rôle de la catalase de *S. aureus* pour contrecarrer l'effet inhibiteur de l'H₂O₂. Il n'est pas possible de conclure sur le rôle de cette enzyme dans la dégradation de l'H₂O₂ dans les milieux puisque la concentration de ce dernier diminue dans les milieux sans *S. aureus*, donc a priori sans catalase. Cette diminution est-elle imputable à la réactivité chimique de l'H₂O₂ car la quantité d'H₂O₂ diminue au cours du temps d'incubation dans un milieu BHI à 4 mmol/l d'H₂O₂. Le manganèse est-il responsable de cette dégradation ? *L. garvieae* est-il capable de dégrader cette molécule par un système de peroxydase ? Ou par une pseudocatalase ? Aux concentrations d'H₂O₂ mesurées celui-ci ne semble pas être toxique pour *L. garvieae*.

La capacité inhibitrice de souches de bactérie lactique par production d'H₂O₂ a été décrite dans la littérature. *S. aureus* peut être inhibé par l'H₂O₂ produit par *Lactococcus lactis* en milieu lait (Haines et Harmon, 1973) ou aussi en milieu gélosé (Ito et al., 2003). Une inhibition par *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ou *Lactobacillus gasseri* a été également observée en bouillon de culture (Ocana et al., 1999; Otero et al., 2006).

La moindre inhibition de *S. aureus* à 30°C pourrait être attribuée à un ratio H₂O₂/densité de cellule de *S. aureus* plus faible à 30°C qu'à 24°C. Elle pourrait être due à une activité catalasique plus élevée à 30°C, hypothèse qui n'est pas appuyée par nos résultats expérimentaux puisque la quantité d'H₂O₂ dosée dans les milieux de culture à 30°C et 24°C est identique. Un tel effet de la température sur l'activité catalasique

avait aussi été noté par Martin et Chaven, (1987). Nos résultats montrent que l'activité catalasique de cellules de *S. aureus* est mesurée après 9 h d'incubation à 30°C et au cours du temps. Ce résultat corrobore ceux de Martin et Chaven, (1987) qui indiquent un maximum de production à 37°C en milieu TSB durant la phase stationnaire de croissance. Il faut aussi noter que la capacité à sécréter des catalases dans le surnageant de culture dépend des souches de *S. aureus* (Kanafani et Martin, 1985). D'autres systèmes enzymatiques que la catalase pourraient être impliqués dans la dégradation de l'H₂O₂. Le rôle d'enzymes telles que la peroxydase reste à étudier.

CHAPITRE 5

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives

Les travaux de cette thèse répondent en partie aux objectifs fixés en terme de maîtriser la croissance de *S. aureus* dans le fromage et de la compréhension des interactions avec des flores du lait cru.

La maîtrise de *S. aureus* dans les fabrications fromagères pourrait s'appuyer sur les résultats générés dans cette thèse (cf. Résultats chapitre 1). Tout d'abord, la relation entre le niveau maximal des *Staphylococcus* coagulase positive atteint dans les fromages à 24 h et leur niveau initial dans le lait doit encourager les producteurs de lait à contrôler la qualité du lait. Nos résultats ont permis de préciser par rapport à la littérature la phase de développement en fromage. Les données de la littérature indiquent uniquement les 24 h ou 48 h pour atteindre le maximum de population (Sesques, 1994; Lamprell, 2003). Notre étude permet de préciser cet optimum. En cours de process, il est impératif de contrôler *S. aureus* durant les six premières heures de fabrication, phase pendant laquelle la croissance de *S. aureus* est la plus importante. Durant cette phase, la température supérieure à 24°C et le pH supérieur à 5,6 favorisent la croissance de *S. aureus*.

Le contrôle du pH à 6 h de fabrication devrait être intégré dans des plans de maîtrise sanitaire car la valeur à ce stade a une incidence sur l'augmentation de la population entre 6 et 24 h.

Nos résultats confirment que le risque de production d'entérotoxines dans les fromages est faible. Celle-ci n'ont jamais été détectées dans les fromages Saint-Nectaire analysés. Par ailleurs, les conditions de 34°C et de pH 6,8 dans lesquelles elles sont produites en milieu de laboratoire (cf. Chapitre 3) ne sont rencontrées que durant les toutes premières heures de fabrication (avant 3 h). Ainsi, dans le cadre d'un plan de contrôle, le dénombrement des *Staphylococcus* coagulase positive et la recherche d'entérotoxines devront s'opérer dans les fromages avant leur entrée en cave (à 4 jours après fabrication).

Nos travaux ouvrent des perspectives pour de nouveaux leviers d'action dans la maîtrise de *S. aureus*. Le peroxyde d'hydrogène considéré comme une substance GRAS à une concentration de 0,05% dans le lait est autorisé en Europe. L'ajout de flores antagonistes productrices d'H₂O₂ dans les laits de fabrication sans maturation risque d'être voué à l'échec si le ratio flores antagonistes/*S. aureus* n'est pas

suffisamment élevé. Nos résultats montrent clairement qu'une densité bactérienne élevée est nécessaire à l'inhibition (cf. Chapitre 3). Par ailleurs, cet ensemencement ne sera efficace que si la température entre 30°C et 24°C est maintenue pendant un temps suffisamment long pour l'expression de l'activité inhibitrice. Les flores antagonistes devront inhiber la croissance de *S. aureus* avant 6 h de fabrication.

Il pourrait être envisagé de maturer le lait en présence de souches de *Lactococcus* capables de produire de l'H₂O₂ à une température (aux environs de 24°C) favorisant l'inhibition. Cette maturation pourrait favoriser le système lactoperoxydase du lait. Avant d'envisager une telle application, des études devront être conduites pour vérifier si la production d'H₂O₂ par des souches de *Lactococcus* peut activer le système LPS et quelles sont les conséquences d'une telle inoculation sur la dynamique des autres populations microbiennes des laits crus tout au long du process et fine sur les qualités des fromages.

Même si *L. garvieae* est peu impliqué dans des infections humaines, elle n'est pas retenue dans la liste des souches ne présentant pas de risques établie par l'European Food Safety Authority (EFSA). Pour envisager son utilisation comme ferment, son innocuité devra être démontrée en s'appuyant sur les recommandations éditées par l'EFSA. Si son ensemencement s'avère impossible il pourrait être envisagé de sélectionner des souches de *Lactococcus lactis* productrices d'H₂O₂.

D'un point de vue méthodologique, il sera nécessaire de développer une méthode fiable de dosage de l'H₂O₂ dans le lait. Les méthodes utilisées dans notre travail n'ont pas permis une quantification. De même le dosage d'activité catalasique dans le lait reste problématique par des méthodes biochimiques. Il pourrait être envisagé un dosage immunologique reposant sur la mise au point d'anticorps spécifiques des catalases microbiennes. Une approche transcriptomique risque de se heurter à des problèmes de seuil de détection et de spécificité pour les ARNm codant pour ces enzymes.

Nos résultats ont permis de préciser les potentialités inhibitrices de *L. garvieae*. Ces propriétés inhibitrices ne sont associées ni à une acidification du milieu ni à la production des bactériocines. La capacité de cette espèce à produire de la garviecine a été évoquée par Villani et al. (2001). La compétition pour des acides aminés dans le milieu lait n'interviendrait pas dans l'inhibition car *S. aureus* se développe en lait sans utilisation des acides aminés (cf. Chapitre 2). L'inhibition serait attribuée à la

production d'H₂O₂. Dans nos conditions d'expérience en milieu de laboratoire, une concentration de 4 mmol/l d'H₂O₂ entraîne une perte de cultivabilité des souches de *S. aureus*. Une observation microscopique des cellules avec des marqueurs de viabilité permettra de mieux cerner l'effet bactéricide ou bactériostatique de l'H₂O₂. Les données de la littérature montrent une grande variabilité des concentrations bactéricides ou bactériostatiques d'une étude à l'autre. Otero et al. (2006) ont observé une altération de la structure membranaire de *S. aureus* en présence d'une souche de *Lactobacillus gasseri* produisant 4 mmol/l d'H₂O₂. Haines et Harmon (1973) ont montré que l'H₂O₂ est bactériostatique à une concentration de 0,18 mmol/l et bactéricide à concentration supérieure à 1 mmol/l. Baldry, (1983) indique que 0,88 mmol/l est bactériostatique de *S. aureus* dans une zone de pH de 5,0 à 8,0 à 35°C. Alasri et al. (1992) ont montré que la sensibilité de *S. aureus* à l'H₂O₂ était moindre que celle de *E. coli* ou *P. aeruginosa* en milieu de laboratoire.

Cette étude devrait se poursuivre par la compréhension des interactions entre une souche productrice d'H₂O₂ et les autres populations microbiennes en milieu lait.

La compréhension des mécanismes d'interaction implique d'identifier les voies métaboliques impliquées d'une part dans la production d'H₂O₂, d'autre part dans sa dégradation. Les voies métaboliques impliquées dans la production d'H₂O₂ par *L. garvieae* devraient être identifiées. Des NADH oxydase, pyruvate oxydase ou lactate oxydase sont-elles impliquées dans la synthèse? Quelle est l'incidence de la composition du milieu, des teneurs en glucose et lactate, du pH sur la production d'H₂O₂? Villegas et Gilliland, (1998) ont montré que le glucose et le lactate étaient nécessaires à la production d'H₂O₂ par *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. La dégradation de l'H₂O₂ dans les milieux de culture devra être élucidée pour faire la part de l'instabilité chimique du composé et de la dégradation enzymatique bactérienne (catalase de *S. aureus*).

Les travaux présentés dans cette thèse fournissent d'une part des éléments scientifiques pour la maîtrise de *S. aureus* dans les fromages, d'autre part, ils mettent en évidence les capacités inhibitrices des *Lactococcus*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références

- Alasri, A., Roques, C., Michel, G., Cabassud, C. and Aptel, P. (1992).** Bactericidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, and chlorine and formaldehyde against bacterial water strains. *Canadian journal of microbiology* **38**, 635-642.
- Altbourn, Z., Hertman, I. and Sarid, S. (1985).** Penicillinase plasmid-linked genetic determinants for enterotoxins B and C1 production in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* **47**: 514-521.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. (2006).** Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1--Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* **17**, 454-461.
- Ananou, S., Valdivia, E., Martínez Bueno, M., Gálvez, A. and Maqueda, M. (2004).** Effect of combined physico-chemical preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain *Journal of Applied Microbiology* **97**, 48–56.
- Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Galvez, A. and Valdivia, E. (2005).** Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Science* **71**, 549-556.
- Andrews, G. P. and Martin, S. E. (1979).** Catalase activity during the recovery of heat-stressed *Staphylococcus aureus* MF-31. *Applied and Environmental Microbiology* **38**, 390-394.
- Archibald, F. S. and Fridovich, I. (1981).** Manganese and Defenses against Oxygen Toxicity in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* **145**, 442-451.
- Aubert, C., Capelle, N., Jeanson, S., Eckert, H., Divies, C. ; Cachon, R., and Lonvaud, A. (2002).** Le potentiel d'oxydoréduction et sa prise en compte dans les procédés d'utilisation des bactéries lactiques. *Sciences des aliments* **22**, 177-187.
- Aubert, C. (2003).** Optimisation de l'utilisation des *Leuconostoc* au cours de la fabrication du Roquefort. Université de Bourgogne - Sciences de l'Alimentation - Spécialité: Microbiologie.
- Avi Eldar, C. G., Asanta, L., Bozzetta, E., Gorla, M., Prearo, M. and Bercovier, H. (1996).** *Enterococcus seriolicida* Is a Junior Synonym of *Lactococcus garvieae*, a Causative Agent of Septicemia and Meningoencephalitis in Fish. *Current Microbiology* **32**, 85-88.
- Bachmann, H. P. and Spahr, U. (1995).** The Fate of Potentially Pathogenic Bacteria in Swiss Hard and Semihard Cheeses Made from Raw Milk. *Journal of Dairy Science* **78**, 476-483.

Balaban, N. and Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology* **61**, 1-10.

Baldry, M. G. (1983). The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *The Journal of applied bacteriology* **54**, 417-423.

Batdorj, B., Trinetta, V., Dalgalarrrondo, M., Prevost, H., Dousset, X., Ivanova, I., Haerte, T. and Chobert, J.-M. (2007). Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*. In press.

Bautista, L, Gaya, P, Medina, M, Nunez, M. (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 566-569.

Bayles, K. W. & Landolo, J. J. (1989). The molecular architecture of the sar locus in Staphylococcal enterotoxin D. *Journal of Bacteriology* **171**, 4799-4806

Becker, K., von Eiff, C., Keller, B., Bruck, M., Etienne, J. and Peters, G. (2005). Thermonuclease gene as a target for specific identification of *Staphylococcus intermedius* isolates: Use of a PCR-DNA enzyme immunoassay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **51**, 237-244.

Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. and Cogan, T. M. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* **11**, 259-274.

Bergdoll, M. S. (1983). Staphylococci and staphylococcal infections. Academic Press London, United Kingdom

Berthier, F., Beuvier, E., Dasen, A. and Grappin, R. (2001). Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comte cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *International Dairy Journal* **11**, 293-305.

Bespalov, A., Igor, B. Z., and Taylor, B. L. (1996). Behavioral responses of *Escherichia coli* to changes in redox potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**: 10084-10089.

Betley, M. J. & Mekalanos, J.J. (1985). Staphylococcal enterotoxin A is encoded by phage. *Science* **229**, 185-187.

Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R. and Parente, E. (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 271-284.

Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F., Andolfi, R. and Moschetti, G. (2002). 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Region Polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as Revealed by PCR and Nucleotide Sequence Analysis. *Systematic and Applied Microbiology* **25**, 520-527.

Bohach, G. A. and Schlievert, P. M. (1987). Nucleotide sequence of the

staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Molecular Genetics and Genomics* **209**, 15-20.

Bohach, G. A. and Schlievert, P. M. (1989). Conservation of the biologically active portions of staphylococcal enterotoxins C1 and C2. *Infection and Immunity* **57**, 2249-2252.

Bonnarme, P., Amarita, F., Chambellon, E., Semon, E., Spinnler, H. E. and Yvon, M. (2004). Methylthioacetaldehyde, a possible intermediate metabolite for the production of volatile sulphur compounds from l-methionine by *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters* **236**, 85–90.

Borst, D. W. and Betley, M. J. (1994). Promoter analysis of the staphylococcal enterotoxin A gene. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 1883-1888.

Boutrou, R. and Guéguen, M. (2005). Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *International Journal of Food Microbiology* **102**, 1-20.

Bowles B. L., Sackitey S. K. and Williams A. C. (1995). Inhibitory effects of flavor compounds on *Staphylococcus aureus* WRRC B124. *Journal of food safety* **15**, 337-347.

Brakstad, O. G., Aasbakk, K. and Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 1654-1660.

Brett, M. (1998). Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 110S–118S.

Buys, E. M., Seifu, E., Donkin, E. F., Petzer, I. M. (2004). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. *Food Control* **15**, 447-452.

Callon, C., Millet, L. and Montel, M.C. (2004). Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research* **71**, 231-44.

Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F. and Montel, M.C. (2006). Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheese. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 172-180.

Callon, C., Gilbert, F.B., De Cremoux, R. and Montel, M.C. (2007). Application of Variable Number of Tandem Repeat analysis to determine the origin of *S. aureus* contamination from milk to cheese in goat cheese farms. *Food Control*. In press.

Casalta, E., Zennaro R., Maroselli, M.-X. and Legouar, R. (1997). Effect of specific starters on microbiological, biochemical and sensory characteristics of Venaco, a Corsican soft cheese. *Sciences des aliments* **17**, 79-94.

Casman, E. P. and Bennett. R. W. (1965). Detection of Staphylococcal Enterotoxin in Food. *Applied Microbiology* **13**, 181-189.

Cintas, L. M., Casaus, P., Havarstein, L. S., Hernandez, P. E. and Nes, I. F. (1997). Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 4321-4330.

Clauditz, A., Resch, A., Wieland, K.-P., Peschel, A. and Gotz, F. (2006). Staphyloxanthin Plays a Role in the Fitness of *Staphylococcus aureus* and Its Ability To Cope with Oxidative Stress. *Infection and Immunity* **74**, 4950-4953.

Clements, Mark O., Watson, Sean P., Foster, Simon J. (199). Characterization of the Major Superoxide Dismutase of *Staphylococcus aureus* and Its Role in Starvation Survival, Stress Resistance, and Pathogenicity. *Journal of Bacteriology* **181**: 3898-3903.

Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C. and Rodriguez, E. (1997). Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research* **64**, 409-421.

Coghill, D. and Juffs, H. S. (1979). Incidence of psychrotrophic bacteria in pasteurized milk and cream products and effect of temperature on their growth. *Journal of Dairy Technology* **34**, 150-153.

Collins, M. D., C. Ash, J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and A. M. Williams. (1989). 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *Journal of Applied Bacteriology* **67**, 453-460.

Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters* **46**, 269-280.

Corroler, D., Mangin, I., Desmaures, N. and Gueguen, M. (1998). An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 4729-4735.

Cosgrove, K., Coutts, G., Jonsson, I.M., Tarkowski, A., Kokai-Kun, J. F., Mond, J. J., Foster, S. J. (2007). Catalase (KatA) and Alkyl Hydroperoxide Reductase (AhpC) Have Compensatory Roles in Peroxide Stress Resistance and Are Required for Survival, Persistence, and Nasal Colonization in *Staphylococcus aureus* *Journal of Bacteriology* **189**: 1025-1035.

Couch, J. L., Soltis, M. T. and Betley, M. J. (1988). Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology* **170**, 2954-2960.

Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini, D., Caramenti, G., Moroni, P. and Castiglioni, B. (2005). Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and Cellular Probes* **19**, 299-305.

Da Silva, E. R., Boechat, J. U. D. and Silva, N. (2006). Coagulase gene

polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from goat mastitis in Brazilian dairy herds. *Letters in Applied Microbiology* **42**, 30-34.

De Buyser, M. L., Lombard, B., Schulten, S. M., In't Veld, P. H., Scotter, S. L., Rollier, P. and Lahellec, C. (2003). Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2: 1999--Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 185-194.

Delbes, C., Ali Mandjee, L. and Montel, M.C. (2007). Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 1882-1891.

Delorme, C., Ehrlich, S. D. and Renault, P. (1992). Histidine biosynthesis genes in *Lactococcus lactis subsp. lactis*. *Journal of Bacteriology* **174**, 6571-6579.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek* **69**, 193-202.

Denis, C., Gueguen, M., Henry, E., Levert, V. (2001). New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Lait* **81**, 365-379.

Devriese, L. A., Poutrel, B., Kilpper-Bälz, R. and Schleifer, K. H. (1983). *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new species from animals. *International Journal of Systematic Bacteriology* **33**, 480-486.

Devriese, L. A. (1984). A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *Journal of Applied Bacteriology* **56**, 215-220.

Devriese, L. A., Vancanneyt, M., Baele, M. and Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**: 1569-1573.

Doehlert, D.H. (1970). Uniform Shells Designs. *Applied Statistics* **19**, 231-239.

Drake, M. A., Harrison, S. L., Asplund, M., Barbosa-Canovas, G. and Swanson, B. G. (1997). High Pressure Treatment of Milk and Effects on Microbiological and Sensory Quality of Cheddar Cheese. *Journal of Food Science* **62**, 843-860.

Drancourt, M. and Raoult, D. (2002). rpoB gene sequence-based identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1333-1338.

Dupont, J., Magnin, S., Marti, A. and Brousse, M. (1999). Molecular tools for identification of *Penicillium* starter cultures used in the food industry. *International Journal of Food Microbiology* **49**, 109-118.

Duthoit, F., Godon, J.J. and Montel, M.C. (2003). Bacterial Community Dynamics during Production of Registered Designation of Origin Salers Cheese as Evaluated by 16S rRNA Gene Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Applied Environment Microbiology*. **69**: 3840-3848.

El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., Pery, P. and Ogier, J. C. (2005). Occurrence

of *Lactococcus garvieae* in four types of Egyptian cheeses by specific polymerase chain reaction assay. *Journal of Dairy Science* **33**, 35-41.

El Helali, N., Carbonne, A., Naas, T., Kerneis, S., Fresco, O., Giovangrandi, Y., Fortineau, N., Nordmann, P. and Astagneau, P. (2005). Nosocomial outbreak of staphylococcal scalded skin syndrome in neonates: epidemiological investigation and control. *Journal of Hospital Infection* **61**, 130-138.

Elsner, H. A., sobottka, I., Mack, D., Laufs, R., Claussen, M. and Wirth, R. (2000). Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **19**, 39-42.

Engels, W. J. M. and Visser S. (1996). Development of cheese flavour from peptides and amino acids by cell-free extracts of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 in a model system. *Nederlands melk en Zuiveltijdschrift* **50**, 3-17.

Ennahar, S. and Deschamps, N. (2000). Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 449-457.

Eraso, A. J. and Ines, A. (2004). Bacteriocin of *Enterococcus* from lactoserum able to cause oxidative stress in *Staphylococcus aureus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **314**, 897-901.

Escalante, A., Wachter, C. and Farres, A. (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology* **64**, 21-31.

Evenson, M. L., Ward Hinds, M., Bernstein, R. S. and Bergdoll, M. S. (1988). Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *International Journal of Food Microbiology* **7**, 311-316.

Fefer, J. J., Ratzan, K. R., Sharp, S. E. and Saiz, E. (1998). *Lactococcus garvieae* endocarditis: report of a case and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **32**, 127-130.

Fihman, V., Raskine, L., Barrou, Z., Kiffel, C., Riahi, J., Bercot, B. and Sanson-Le Pors, M. (2006). *Lactococcus garvieae* endocarditis: identification by 16S rRNA and sodA sequence analysis. *Journal of Infection* **52**, e3-e6.

Fitzgerald, J.R., Monday, S. R., Foster, T. J., Bohach, G. A., Hartigan, P. J., Meaney, W. J. & Smyth, C. J. (2001). Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *Journal of Bacteriology* **183**, 63-70.

Fleet, G. H. (1990). Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* **68**, 199-211.

Florentin, C. (2000). Mise au point d'un levain acidifiant et inhibiteur de *Staphylococcus aureus* pour le fromage Saint-Nectaire. I.S.V.T. Saint-Dominique -

Vals. 43000 Le Puy-en-Velay. Notes: Rapport BTS Anabiotec.

Floret, D. (2001). Aspects cliniques des syndromes toxiques streptococciques et staphylococciques. Clinical aspects of staphylococcal and streptococcal toxic diseases. *Archives de Pédiatrie* **8**, 762-768.

Forsman, P., Tilsala-Timisjarvi, A. and Alatossava, T. (1997). Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. *Microbiology* **143**, 3491-3500.

Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A. and Manachini, P. L. (2003). Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology* **20**, 397-404.

Fox, L. K., Zadoks, R. N. and Gaskins, C. T. (2005). Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology* **107**, 295-299.

Francois, P., Huyghe, A., Charbonnier, Y. and Schrenzel, J. (2005). Use of an Automated Multiple-Locus, Variable-Number Tandem Repeat-Based Method for Rapid and High-Throughput Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 3346-3355.

Freney, J., Kloos, W., Hajek, V., Webster, J., Bes, M., Brun, Y. and Vernozy-Rozand, C. (1999). Recommended minimal standards for description of new staphylococcal species. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 489-502.

Fuente, D. L. R., Suarez, G. and Schleifer, K.H. (1985). *Staphylococcus aureus* subsp. *anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**, 99-102.

García, M.C., Rodríguez, M.J., Bernardo, A., Tornadijo, M.E. and Carballo, J. (2002). Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simón cheese. *Food Microbiology* **19**, 23-33.

Garrity, G.M. and Holt J.G. (2001) - Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J. and Cogan, T.M. (2001). Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 177-188.

Gilliland, S. E., and M. L. Speck. (1969). Biological response of lactic streptococci and lactobacilli to catalase. *Journal of Applied Microbiology* **17**:797-800.

Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 215-222.

Gomez-Lucia, E., Goyache, J., Orden, J.A., Domenech, A., Javier Hernandez, F., Ruiz-Santa Quiteria, J.A., Lopez, B., Blanco, J.L. and Suarez, G. (1992). Growth of *Staphylococcus aureus* and synthesis of enterotoxin during ripening of

experimental Manchego-type cheese. *Journal of Dairy Science* **75**, 19-26.

Gonzalez-Fandos M.E., Sierra M.L., Garcia-Lopez M.L., Otero A., Sanz J., Moreno B. (1996). Staphylococcal Growth and Enterotoxin Production in the Presence of Meat Cultures (Non LAB). *Meat Science* **43**, 255-263.

Grundmann, H., Hori, S., Enright, M. C., Webster, C., Tami, A., Feil, E. J. and Pitt, T. (2002). Determining the Genetic Structure of the Natural Population of *Staphylococcus aureus*: a Comparison of Multilocus Sequence Typing with Pulsed-Field Gel Electrophoresis, Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis, and Phage Typing. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 4544-4546.

Gueguen, M. and Schmidt, J.L. (1992). Les levures et *Geotrichum candidum*. *Les Groupes Microbiens d'Intérêt Laitier* 165-219.

Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M. and Vaillant, V. (2002). Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* **23**, 105-109.

Haines, W.C. and Harmon, L.G. (1973). Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. *Applied Microbiology* **25**, 436-441.

Hajek, V. and Marsalek, E. (1971). The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zentralblatt fur Bakteriologie* **2**, 176-182.

Hamama, A., El Hankouri, N. and El Ayadi, M. (2002). Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. *International Dairy Journal* **12**, 933-938.

Han, B. Z., Sesenna, B., Beumer, R. R. and Robert N., M. J. (2005). Behaviour of *Staphylococcus aureus* during sufu production at laboratory scale. *Food Control* **16**, 243-247.

Hechard, Y. and Sahl, H.G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84**, 545-557.

Hennekinne, J.A., Kerouanton, A., Brisabois, A. and De Buyser. M.L. (2003). Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 321-329.

Hernandez, D., Cardell, E. and Zarate, V. (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 77-84.

Horsburgh, Malcolm J., Ingham, Eileen, Foster and Simon J. (2001). In *Staphylococcus aureus*, Fur Is an Interactive Regulator with PerR, Contributes to Virulence, and Is Necessary for Oxidative Stress Resistance through Positive Regulation of Catalase and Iron Homeostasis. *Journal of Bacteriology* **183**: 468-475.

Hovde, C. J., Hackett, S.P. and Bohach, G. A. (1990). Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C3 gene sequence comparison of all three type C staphylococcal enterotoxins. *Molecular and General Genetics* **220**, 329-333.

Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annual Review of Microbiology* **57**, 395-418.

Irlinger, F. (2000). Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêt technologique, de la surface des fromages. Thèse, Institut National Agronomique Paris-Grignon.

Irlinger, F., Bimet, F., Delettre, J., Lefèvre M. and Grimont, P.A.D. (2005). *Arthrobacter bergerei* sp. Nov. and *Arthrobacter arilaitensis* sp. Nov., novel coryneform species isolated from the surfaces of cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 457-462.

Irlinger, F. (2005). La flore de surface des fromages a croûte lavée. In *Les fermentations au service des produits de terroir* ed. Montel, M.C., Béranger, C. and Bonnemaire, J. pp. 215-226. Paris.

Irlinger, F., Morvan, A., El Solh, N. and Bergère, J.-L. (1997). Taxonomic characterization of coagulase-negative Staphylococci in ripening flora from traditional french cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, 319-328.

Isigidi, B., Devriese, L., Godard., C. et Van Hoof, J. (1990). Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. *Letters in Applied Microbiology* **11**, 145-147.

Isolini, D., Grand, M. and Glättli, H. (1990). Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen. *Schweiz. Milchw. Forschung.* **19**, 57-59.

Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., and Toba, T. (2003). The Screening of Hydrogen Peroxide-Producing Lactic Acid Bacteria and Their Application to Inactivating Psychrotrophic Food-Borne Pathogens. *Current Microbiology* **47** , 231–236.

Jarraud, S., Peyrat, M. A., Lim, A. and other authors (2001). egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of sperantigens in *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Immunology* **166**, 669-677.

Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* **44**, 525-532.

Jersek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N. and Herman, L. (1999). Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence- based PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 103-109.

Jorgensen, H. J., Mork, T. and Rorvik, L. M. (2005). The Occurrence of

Staphylococcus aureus on a Farm with Small-Scale Production of Raw Milk Cheese. *Journal of Dairy Science* **88**, 3810-3817.

Kabara, J. J. (1980). Lipids as host-resistance factors of human milk. *Nutrition Reviews* **38**, 65-73.

Kamau, D. N., Doores, S. and Pruitt, K. M. (1990). Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in milk. *Journal of Food Protection* **53**, 1010-1014.

Kanafani, H. and Martin, S. E. (1985). Catalase and superoxide dismutase activities in virulent and nonvirulent *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **21**, 607-610.

Kanai, K. and Kondo E. (1979). Antibacterial and cytotoxic aspects of long-chain fatty acids as cell surface events: selected topics. *Japanese journal of medical science & biology* **32**, 135-74.

Kawanishi, M., Yoshida, T., Yagashiro, S., Kijima, M., Yagyu, K., Nakai, T., Murakami, M., Morita, H. and Suzuki, S. (2006). Differences between *Lactococcus garvieae* isolated from the genus *Seriola* in Japan and those isolated from other animals (trout, terrestrial animals from Europe) with regard to pathogenicity, phage susceptibility and genetic characterization. *Journal of Applied Microbiology* **101**, 496-504.

Keller, G.M., Hanson, R.S. and Bergdoll, M.S. (1978). Molar growth yields and enterotoxin B production of *Staphylococcus aureus* with amino acids as energy sources. *Infection and Immunity* **20**, 151-157.

Khambaty, F. M., Bennett, R. W. and Shah, D. B. (1994). Application of pulsed-field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiology and infection* **113**, 75-81.

Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A. and Zinedine, A. (2007). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological Research* **In Press**, Corrected Proof.

Klaenhammer, R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Microbiology Reviews* **12**, 39-86.

Kloos, W. E. and Schleifer, K. H. (1986). Genus IV. *Staphylococcus* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. P. H. Sneath. Baltimore, William & Wilkins. **2**, 1013 -1035.

Kloos, W. E., Ballard, D. N., George, C. G., Webster, J. A., Hubner, R. J., Ludwig, W., Schleifer, K. H., Fiedler, F. and Schubert, K. (1998). Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equipercicus* sp. nov., and *Macrococcus bovicus* sp. no.

and *Macrocooccus carouselicus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48** Pt 3, 859-877.

Knapp, H. R. and Melly, M. A. (1986). Bactericidal effects of polyunsaturated fatty acids. *The journal of infectious diseases* **154**, 84-94.

Kok, J., Buist, G., Zomer, A. L., van Hijum, S. A. F. T. and Kuipers, O. P. (2005). Comparative and functional genomics of lactococci. *FEMS Microbiology Reviews* **29**, 411-433.

Kranenburg, R. v., Kleerebezem, M., Hylckama-Vlieg, J. v., Ursing, B. M., Boekhorst, J., Smit, B. A., Ayad, E. H. E., Smit, G. and Siezen, R. J. (2002). Flavour formation from amino acids by lactic and bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal* **12**, 111-121.

Krimmer, V., Merkert, H., von Eiff, C., Frosch, M., Eulert, J., Lohr, J. F., Hacker, J. and Ziebuhr, W. (1999). Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in Clinical Samples by 16S rRNA-Directed In Situ Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* **37**, 2667-2673.

Kusuda, R., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R. and Fryer, J.L. (1991). *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**, 406-409.

Kwok, A. Y. C. and Chow, A. W. (2003). Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Macrocooccus* species based on partial hsp60 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 87-92.

Ladhani, S. (2003). Understanding the mechanism of action of the exfoliative toxins of *Staphylococcus aureus*: Viral Evolution and Molecular Epidemiology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **39**, 181-189.

Lamprell, H. (2003). La production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. thèse, Université de Bourgogne - Sciences de l'Alimentation - Spécialité: Microbiologie.

Lamprell, H., Mazerolles, G., Kodjo, A., Chamba, J. F., Noel, Y. and Beuvier, E. (2006). Discrimination of *Staphylococcus aureus* strains from different species of *Staphylococcus* using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology* **108**, 125-129.

Lapeyre, C., Kaveri, S.V., Janin, F. and Strosberg, A.D. (1987). Production and characterization of monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins: use in immunodetection and immunopurification. *Molecular Immunology* **24**, 1243-54.

Lapeyre, C., DeSolan, M., Drouet, X. (1996). Immunoenzymatic detection of Staphylococcal enterotoxins: International interlaboratory study. *Journal of AOAC*

International **79**, 1095-1101.

Laukova, A. and Czikkova, S. (1999). The use of enterocin CCM 4231 in soy milk to control the growth of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 182-186.

Lawrynowicz-Paciorek, M., Kochman, M., Piekarska, K., Grochowska, A. and Windyga, B. (2007). The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. *International Journal of Food Microbiology* **In Press**, Corrected Proof.

Le Loir, Y., Baron, F. and Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* **2**, 63-76.

Leclercq-Perlat, M. N., Oumer, A., Bergere, J. L., Spinnler H.E. and Corrieu, G. (1999). Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. *Journal of Dairy Research* **66**, 271-281.

Ledda, A., Floris, R., Mannu, L. and Scintu, M. F. (1996). Studies on the microbial population and ecosystem of Pecorino Sardo cheese made from raw ewe's milk. Third Plenary Meeting COST95 Action.

Letertre, C., Perelle, S., Dilasser, F. and Fach, P. (2003). Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology* **91**, 1023-1029.

Leyden, J. J., Richard, R., Marplesand, A., Kligman, M. (1974). *Staphylococcus aureus* in the lesions of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* **90**, 525-530.

Liao, C. C., Yousef A. E., Chism G. W. and Richter E. R. (1994). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in buffer, culture media and foods by lacidin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* OSU133. *Journal of food safety* **14**, 87-101.

Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, Maria G. de Fatima, M., Zuliani, J. and Fontana, R. (2002). Evaluation of the VITEK 2 System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Medically Relevant Gram-Positive Cocci. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1681-1686.

Lin, M. Y. and Yen, C. L. (1999). Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**, 1460 -1466.

Lina, G., Bohach, G. A., Nair., S. P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E. & Mariuzza, R. (2004). Standard Nomenclature for the superantigens Expressed by *Staphylococcus*. *The Journal of Infectious Diseases* **189**, 2334-2336.

Lincoln, R. A., Leigh, J. A. and Jones, N. C. (1995). The amino acid requirements of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis. *Veterinary Microbiology* **45**, 275-279.

- Lopez-Diaz, T. M., Alonso, C., Roman, C., Garcia-Lopez, M. L. and Moreno, B. (2000).** Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology* **17**, 23-32.
- Macedo, A. C., Malcata, F. X. and Hogg, T. A. (1995).** Microbiological profile in Serra ewes' cheese during ripening. *Journal of Applied Microbiology* **79**, 1-11.
- Macedo, A. C., Tavares, T. G. and Malcata, F. X. (2004).** Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiology* **21**, 233-240.
- Maisnier-Patin, S., Forni, E. and Richard, J. (1996).** Purification, partial characterisation and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecalis* isolated from a cheese. *International Journal of Food Microbiology* **30**, 255-270.
- Marino, M., Maifreni, M., Moret, S. and Rondinini, G. (2000).** The capacity of *Enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology* **31**, 169-173.
- Markus, Z.H. and Silverman, G.J. (1970).** Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A. *Applied Microbiology* **20**, 492-6.
- Martin, S. E. and Chaven, S. (1987).** Synthesis of catalase in *Staphylococcus aureus* MF-31. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 1207-1209.
- Martin, P. K., Li, T. S., DongXu, B., Donald P., Schmid, M. B. (1999).** Role in Cell Permeability of an Essential Two-Component System in *Staphylococcus aureus*. *Journal Bacteriology* **181**, 3666-3673.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M. and Bergeron, M. G. (1998)** Species-Specific and Ubiquitous-DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 618-623.
- Marty-Teyssset, C., de la Torre, F., Garel, J.-R. (2000).** Increased Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon Aeration: Involvement of an NADH Oxidase in Oxidative Stress. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 262-267.
- Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Gonzalez, J., Rebollo, J. E. and Cáceres, P. (2002).** Iborea goat's milk cheese: microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Lait* **82**, 579-587.
- Matos, J. S., White, D. G., Harmon, R. J. and Langlois, B. E. (1991).** Isolation of *Staphylococcus aureus* from Sites Other than the Lactating Mammary Gland. *Journal of Dairy Science* **74**, 1544-1549.
- Mayeux, J. V., W. E. Sandine, and P. R. Elliker. (1962).** A selective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures. *Journal of Dairy Science*, **45**:655.

- McLay, J. C., Kennedy, M. J., Orourke, A. L., Elliot, R. M. and Simmonds, R. S. (2002).** Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin. *International journal of food microbiology* **73**,1-9.
- Medina, M., Nuez, M., Arqués, J. L. and Calzada, J. (2005).** Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *International Dairy Journal* **15**, 51-57.
- Meyrand, A., Boutrand-Loei, S., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Gaspard, C. E., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C. and Vernozzy-Rozand, C. (1998).** Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *Journal of Applied Microbiology* **85**, 537-544.
- Meyrand, A. and Vernozzy-Rozand, C. (1999).** Croissance et entérotoxino-génèse de *Staphylococcus aureus* dans différents fromages. *Revue de Médecine Vétérinaire* **150**, 1-16.
- Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J. J., Le Loir, Y., Oliveira, S. C., Langella, P. and Azevedo, V. (2003).** Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research* **2**, 348-359.
- Mofredj, A., Baraka, D., Cadranel, J. F., LeMaitre, P., Kloeti, G. and Dumont, J. L. (2000).** *Lactococcus garvieae* septicemia with liver abscess in an immunosuppressed patient. *The American Journal of Medicine* **109**, 513-514.
- Molimard, P. and Spinnler, H. E. (1996).** Review: compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science* **79**, 169-184.
- Monnet, V., Chapot-Chartier, M. P. and Gripon J. C. (1993).** Les peptidases des lactocoques. *Lait* **73**, 97-108.
- Morea, M., Baruzzi, F. and Cocconcelli, P. S. (1999).** Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional mozzarella cheese processing. *Journal of Applied Microbiology* **87**, 574-582.
- Morgan, S. M., Ross, R. P., Beresford, T. and Hill, C. (2000).** Combination of hydrostatic pressure and lacticin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 414-420.
- Moroni, P., Pisoni, G., Antonini, M., Ruffo, G., Carli, S., Varisco, G. and Boettcher, P. (2005).** Subclinical Mastitis and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus caprae* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Two Italian Goat Herds. *Journal of Dairy Science* **88**, 1694-1704.
- Mortensen, J. E., Shryock, T. R. and Kapral, F. A. (1992).** Modification of bactericidal fatty acids by an enzyme of *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology* **36**,293-298.
- Mossel, D.A. and van Netten, P. (1990).** *Staphylococcus aureus* and related

staphylococci in foods: ecology, proliferation, toxinogenesis, control and monitoring. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* **19**, 123S-145S.

Munson, S. H., Tremaine, M. T., Betley, M. J. and Welch, R. A. (1998). Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* **66**, 3337-3348.

Nagase, N., Sasaki, A., Yamashita, K., Shimizu, A., Wakita, Y., Kitai, S. and Kawano, J. (2001). Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. *Journal of Veterinary Medical Science* **64**, 245-250.

Nakano, S., Kobayashi, T., Funabiki, K., Matsumura, A., Nagao, Y. and Yamada, T. (2004). Pcr Detection of *Bacillus* and *Staphylococcus* in Various Foods. *Journal of Food Protection* **67**, 1271-1277.

Novick, R. P. (2003). Autoinduction and signal transduction in the regulation of staphylococcal virulence. *Molecular Microbiology* **48**, 1429–1449.

Ocana, V.S., de Ruiz Holgado, A.A. and Nader-Macias, M.E. (1999). Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **23**, 87-92.

Ogier, J.C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P. and Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 3691-3701.

Olasupo, N. A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H. and Holzapfel, W. H. (1999). Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. *International Journal of Food Microbiology* **53**, 141-152.

Oliveira, M., Bexiga, R., Nunes, S. F., Carneiro, C., Cavaco, L. M., Bernardo, F. and Vilela, C. L. (2006). Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology* **118**, 133-140.

Omoe, K., Hu, D. L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A. and Shinagawa, K. (2003). Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by tow kinds of plasmids. *Infection and Immunity* **71**, 6088-6094.

Omoe, K., Hu, D. L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A. and Shinagawa, K. (2005). Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. *FEMS Microbiology Letters* **246**, 191-198.

Onoue, Y. and Mori, M. (1997). Amino acid requirements for the growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. *International Journal of Food Microbiology* **36**, 77-82.

Orwin, P. M., Leung, D. Y., Donahue, H. L., Novick, R. P. and Schlievert, P. M.

(2001). Biochemical and biological properties of Staphylococcal enterotoxin K. *Infection and Immunity* **69**, 360-366.

Otero, A., Garcia, M. C., Garcia, M. L., Santos, J. A. and Moreno, B. (1993). Behaviour of *Staphylococcus aureus* strains FRI 137 and FRI 361 during the manufacture and ripening of Manchego cheese. *International Dairy Journal* **3**, 85-96.

Otero, M. and Nader-Macias, M. E. (2006). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science* **96**, 35-46.

Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M. and Swings, J. (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters* **251**, 267-271.

Ouvry, A., Wache, Y., Tourdot-Marechal, R., Divies, C. and Cachon, R. (2002). Effects of oxidoreduction potential combined with acetic acid, NaCl and temperature on the growth, acidification, and membrane properties of *Lactobacillus plantarum*. *FEMS Microbiology Letters* **214**, 257-261.

Pantucek, R., Gotz, F., Doskar, J. and Rosypal, S. (1996). Genomic variability of *Staphylococcus aureus* and the other coagulase- positive *Staphylococcus* species estimated by macrorestriction analysis using pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 216-222.

Patterson, M.F. and Kilpatrick, D.J. (1998). The combined effect of high hydrostatic pressure and mild heat on inactivation of pathogens in milk and poultry. *Journal of Food Protection* **61**, 432-436.

Pimbley, D. and Patel, P. (1998). A review of analytical methods for detection of bacterial toxins. *Journal of Applied Microbiology* **84**, 98S-109s.

Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R. and Teuber, M. (2003). *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* **26**, 30-37.

Poyart, C., Berche, P. and Trieu-Cuot, P. (1995). Characterization of superoxide dismutase genes from Gram-positive bacteria by polymerase chain reaction using degenerate primers. *FEMS Microbiology Letters* **131**, 41-45.

Pradel, G., et al. Report R97/22 (1999). Recherches pour la mise au point d'un levain lactique adapté à la fabrication des fromages Saint-Nectaire au lait cru afin d'inhiber le développement de *staphylococcus aureus*.

Pu, Z. Y., Dobos, M., Limsowtin, G. K. Y. and Powell, I. B. (2002). Integrated polymerase chain reaction-based procedures for the detection and identification of species and subspecies of the Gram-positive bacterial genus *Lactococcus*. *Journal of Applied Microbiology* **93**, 353-361.

- Ramesh, A., Padmapriya, B. P., Chrashekar, A. and Varadaraj, M. C. (2002).** Application of a convenient DNA extraction method and multiplex PCR for the direct detection of *Staphylococcus aureus* and *Yersinia enterocolitica* in milk samples. *Molecular and Cellular Probes* **16**, 307-314.
- Ratomahenina, R., Van den Boom, S., Galzy, S. and Dieu, B. (1995).** Study of growth parameters of *Cylindrocarpum* sp., a mould isolated from Saint-Nectaire cheese. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* **17**, 169-171.
- Reinoso, E. B., El-Sayed, A., Lammler, C., Bogni, C. and Zschock, M. (2006).** Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from humans, bovine subclinical mastitis and food samples in Argentina. *Microbiological Research*. In Press.
- Repine, J. E., Fox, R. B. and Berger, E. M. (1981).** Hydrogen peroxide kills *Staphylococcus aureus* by reacting with staphylococcal iron to form hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 7094-7096.
- Riondet, C., Cachon, R., Wache, Y., Alcaraz, G. and Divies, C. (2000).** Extracellular Oxidoreduction Potential Modifies Carbon and Electron Flow in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **182**, 620-626.
- Rochat, T., Gratadoux, J. J., Gruss, A., Corthier, G., Maguin, E., Langella, P. and Maarten, V. G. (2006).** Production of a Heterologous Nonheme Catalase by *Lactobacillus casei*: an Efficient Tool for Removal of H₂O₂ and Protection of *Lactobacillus bulgaricus* from Oxidative Stress in Milk. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 5143-5149.
- Rodriguez, E., Arques, J. L., Gaya, P., Tomillo, J., Nunez, M. and Medina, M. (2000).** Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. *Milchwissenschaft* **55**, 633-635.
- Rodríguez-Calleja, J. M., García-López, I., Santos, J. A., Otero, A. and García-Lopez, M. L. (2006).** Molecular and phenotypic typing of *Staphylococcus aureus* isolates from rabbit meat. *Research in Microbiology* **157**, 496-502.
- Sabat, A., Krzyszton-Russjan, J., Strzalka, W., Filipek, R., Kosowska, K., Hryniewicz, W., Travis, J. and Potempa, J. (2003).** New Method for Typing *Staphylococcus aureus* Strains: Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis of Polymorphism and Genetic Relationships of Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 1801-1804.
- Salama, M., Sandine, W. and Giovannoni, S. (1991).** Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **57**, 1313-8.
- Salminen, S., Wright, A. v., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., M. de Vos, W., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.-E. and Mattila-Sandholm, T. (1998).** Demonstration of safety of probiotics - a review. *International Journal of Food Microbiology* **44**, 93-106.

- Sanchez, I., Sesena, S., Poveda, J. M., Cabezas, L. and Palop, L. (2006).** Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology* **107**, 265-273.
- Sanders, J.W., Leenhouts, K.J., Haandrikman, A.J., Venema, G. and Kok, J. (1995).** Stress response in *Lactococcus lactis*: cloning, expression analysis, and mutation of the lactococcal superoxide dismutase gene. *Journal of Bacteriology* **177**: 5254-5260.
- Schleifer, K., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Baelz, R., Collins, MD. and Fischer, W. (1985).** Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology* **6**, 183-195.
- Sedewitz, B, Schleifer, K H, Gotz, F. (1984).** Physiological role of pyruvate oxidase in the aerobic metabolism of *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology* **160**, 462-465.
- Seki, M., Iida, K. I., Saito, M., Nakayama, H. and Yoshida, S. I. (2004).** Hydrogen Peroxide Production in *Streptococcus pyogenes*: Involvement of Lactate Oxidase and Coupling with Aerobic Utilization of Lactate. *Journal of Bacteriology* **186**, 2046-2051.
- Sesques, M. (1994).** Staphylocoques à coagulase positive dans le fromage fermier au lait cru de Saint-Nectaire : Origine, développement et risques de production d'entérotoxines. Thèse, université Claude Bernard de Lyon I.
- Shafer, W. M. and Iandolo, J. J. (1978).** Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. *Infection and Immunity* **20**, 273-278.
- Slanetz, L. W. and Bartley, C. H. (1957).** Numbers of Enterococci in water, sewage and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology* **75**, 591-596.
- Smith, E. M., Green, L. E., Medley, G. F., Bird, H. E. and Dowson, C. G. (2005).** Multilocus Sequence Typing of *Staphylococcus aureus* Isolated from High-Somatic-Cell-Count Cows and the Environment of an Organic Dairy Farm in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology* **43**, 4731-4736.
- Sorhaug, T. and Stepaniak, L. (1997).** Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science & Technology* **8**, 35-41.
- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. (1997).** Proposal for a New Hierarchic Classification System, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**, 479-491.
- Stecchini, M. L., Sarais, I. and Bertoldi, M. d. (1991).** The influence of *Lactobacillus plantarum* culture inoculation on the fate of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* in Montasio cheese. *International Journal of Food Microbiology* **14**, 99-109.

Stepan, J., Pantucek, R., Ruzickova, V., Rosypal, S., Hajek, V. and Doskar, J. (2001). Identification of *Staphylococcus aureus* based on PCR amplification of species specific genomic 826 bp sequence derived from a common 44-kb Sma I restriction fragment. *Molecular and Cellular Probes* **15**, 249-257.

Stewart, C.M., Cole, M.B., Legan, J.D., Slade, L., Schaffner, D.W. (2005). Solute-specific effects of osmotic stress on *Staphylococcus aureus* *Journal of Applied Microbiology* **98**, 193–202.

Su, Y.-C. and Wong, A. C. L. (1998). Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 87-91.

Sutherland, J. P., Bayliss, A. J. and Roberts, T. A. (1994). Predictive modelling of growth of *Staphylococcus aureus*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* **21**, 217-236.

Tailliez, P., Tremblay, J., Ehrlich, S.D. and Chopin, A. (1998). Molecular Diversity and Relationship Within *Lactococcus Lactis*, as Revealed by Randomly Amplified Polymorphic Dna (Rapid). *Systematic and Applied Microbiology* **21**, 530-538.

Talon, R., Walter, D., Chartier, S., Barriere, C. and Montel, M. C. (1999). Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* **52**, 47-56.

Teixeira, L. M., Merquior, V. L., Vianni, M. d. C. E., Carvalho, M. d. G. S., Fracalanza, S. E. L., Steigerwalt, A. G., Brenner, D. J. and Facklam, R. R. (1996). Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Lactococcus garvieae* strains isolated from water buffalos with subclinical mastitis and confirmation of *L. garvieae* as a senior subjective synonym of *Enterococcus seriolicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 664-668.

Terzaghi, B. E., and W. E. Sandine. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology* **29**, 807–813.

Thomas, L. V. and Wimpenny, J. W. (1996). Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**, 2006-2012.

Tierno, P. M. and Stotzkym G. (1978). Differentiation by electrophoresis and enzymoserology of proteinases, produced by strains of *Staphylococcus epidermidis* biotypes 1 and 4. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **8**, 42-49.

Tornadijo, M.E., Garcia, M.C., Fresno, J.M. and Carballo, J. (2001). Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simon cheese. *Food Microbiology* **18**, 499-509.

Tow, L. and Cowan, D. A. (2003). Non-specificity of *Staphylococcus* generic primers. *Microbiology* **149**, 1605.

Turner, N., Sandne, P. R.E and Day, A. (1963). Use of tetrazolium dyes in an agar medium for differentiation of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Science* **46**,380-385.

Urwin, R. and Maiden, M. C. (2003). Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology* **11**, 479-487.

Valdes-Stauber, N., Scherer, S. and Seiler, H. (1997). Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* **34**, 115-129.

Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D. and Guerzoni, M. E. (2004). Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 123-135.

Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J. M., Huard, C. and Pepin, M. (2003). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology* **96**, 69-79.

Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001). *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews***14**. 584-640.

Vela, A. I., Vazquez, J., Gibello, A., Blanco, M. M., Moreno, M. A., Liebana, P., Albendea, C., Alcalá, B., Mendez, A., Dominguez, L. and Fernandez-Garayzabal, J. F. (2000). Phenotypic and Genetic Characterization of *Lactococcus garvieae* Isolated in Spain from Lactococcosis Outbreaks and Comparison with Isolates of Other Countries and Sources. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3791-3795.

Vendrell D., Balcazar J.L., Ruiz-Zarzuola I., de Blas I., Girones O. and Muzquiz J.L. (2006). *Lactococcus garvieae* in fish: A review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **29**, 177-198.

Ventosa, A., Marquez, M. C., Ruiz-Berraquero, F. and Kocur, M. (1990). *Salinicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., a new moderately halophilic gram-positive coccus. *Systematic and Applied Microbiology* **13**, 29-33.

Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Meugnier, H., Bes, M., Lasne, Y., Fiedler, F., Etienne, J. and Freney, J. (2000). *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology* **50 Pt 4**, 1521-1527.

Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Prevost, G., Lapeyre, C., Bes, M., Brun, Y. and Fleurette, J. (1996). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology* **30**, 271-280.

- Vernozy-Rozand, C., Meyrand, A., Mazuy, C., Delignette-Muller, M. L., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C. and Richard, Y. (1998).** Behaviour and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. *Journal of Dairy Research* **65**, 273-281.
- Vilhelmsson, O. and Miller, K. J. (2002).** Humectant Permeability Influences Growth and Compatible Solute Uptake by *Staphylococcus aureus* Subjected to Osmotic Stress. *Journal of Food Protection* **65**, 1008–1015.
- Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O. and Moschetti, G. (2001).** Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 430-439.
- Villegas, E. and Gilliland, E.S. (1998).** Hydrogen Peroxide Production by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *lactis* I at 5°C. *Journal of Food Science* **63**, 1070-1074.
- Voegas, C.A. and Sa-Correia, I. (1991).** Activation of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* by octanoic. *Journal of General Microbiology* **137**, 645-651.
- Voytenko, A. V., Kanbar, T., Alber, J., Lammler, C., Weiss, R., Prenger-Berninghoff, E., Zschock, M., Akineden, O., Hassan, A. A. and Dmitrenko, O. A. (2006).** Identification of *Staphylococcus hyicus* by polymerase chain reaction mediated amplification of species specific sequences of superoxide dismutase A encoding gene *sodA*. *Veterinary Microbiology* **116**, 211-216.
- Whiting, R. C., Sackitey, S., Calderone, S., Morely, K. and Phillips, J. G. (1996).** Model for the survival of *Staphylococcus aureus* in nongrowth environments. *International Journal of Food Microbiology* **31**, 231-243.
- Yang, X. and Ma, K. (2005).** Determination of hydrogen peroxide generated by reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *Analytical Biochemistry* **344**, 130-134.
- Yap, P. S. and Gilliland, S. E. (2000).** Comparison of Newly Isolated Strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* for Hydrogen Peroxide Production at 5°C. *Journal of Dairy Science* **83**, 628-632.
- Yoon, J.-H. L. K. C., Weiss, N., Kang, K. H. and Park, Y.-H. (2003).** *Jeotgalicoccus halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Jeotgalicoccus psychrophilus* sp. nov., isolated from the traditional Korean fermented seafood jeotgal. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, 595-602.
- Yugueros, J., Temprano, A., Sanchez, M., Luengo, J. M. and Naharro, G. (2001).** Identification of *Staphylococcus* spp. by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism of *gap* Gene. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3693-3695.

Yvon, M. (2006). Key enzymes for flavour formation by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology* **61**, 89-96.

Zadoks, R. N., van Leeuwen, W. B., Kreft, D., Fox, L. K., Barkema, H. W., Schukken, Y. H. and van Belkum, A. (2002). Comparison of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine and Human Skin, Milking Equipment, and Bovine Milk by Phage Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Binary Typing. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3894-3902.

Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. and De Vuyst, L. (2006). Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology* **29**, 487-495.

Zecconi, A., Cesaris, L., Liandris, E., Dapra, V. and Piccinini, R. (2006). Role of several *Staphylococcus aureus* virulence factors on the inflammatory response in bovine mammary gland. *Microbial Pathogenesis* **40**, 177-183.

Zhang, S., Iandolo, J. J. and Stewart, G. C. (1998). The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiology Letters* **168**, 227-233.

Zlotkin, A., Eldar, A., Ghittino, C. and Bercovier, H. (1998). Identification of *Lactococcus garvieae* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 983-985.

Zottola, E. A., Yezzi, T. L., Ajao, D. B. and Roberts, R. F. (1994). Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 227-238.

ANNEXES

ANNEXE 1

Composition des milieux de cultures

GELOSE M17

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose M17 est utilisée pour le dénombrement des Streptocoques lactiques dans les produits laitiers. Les différents constituants du milieu permettent une meilleure croissance des microorganismes à dénombrer. Le lactose est fermenté en acide lactique, neutralisé par le glycérophosphate.

Documents de références

Terzaghi, B.E. et Sandine, W.E., 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages, *Applied Microbiology*, 29, 807-813.

Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 57,2 g de milieu prêt à l'emploi (BK 088)

OU peser :

- 2,5 g de tryptone
- 2,5 g de peptone trypsique de viande
- 5,0 g de peptone papaïque de soja
- 2,5 g d'extrait de levure
- 5,0 g d'extrait de viande
- 5,0 g de lactose
- 19,0 g de glycérophosphate de sodium
- 0,25 g de sulfate de magnésium
- 0,5 g d'acide ascorbique
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 20 min à 115°C.

Refroidir à 48°C et couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

Incubation

Pour dénombrer les streptocoques thermophiles, les boîtes sont incubées à 42°C 24H.

Pour dénombrer les streptocoques mésophiles, les boîtes sont incubées à 30°C 48H.

Lecture

Compter toutes les colonies de la boîte.

GELOSE OGA : Oxytétracycline Gélose Agar

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose OGA est utilisée pour la recherche et le dénombrement des levures et moisissures dans les produits laitiers et les produits cosmétiques.

La croissance des levures et des moisissures est favorisée en présence de glucose et d'extrait de levure. L'addition extemporanée d'oxytétracycline permet d'inhiber les bactéries.

Documents de références

FIL-IDF 94 B, 1991. Lait et produits laitiers. Dénombrement des levures et des moisissures. Comptage des colonies à 25°C.

Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 22,0 g de milieu prêt à l'emploi (BK 053)

OU peser :

- 5,0 g d'extrait autolytique de levure
- 10,0 g d'extrait de viande
- 20,0 g de glucose
- 1,08 g de tween 80
- 2,0 g de phosphate dipotassique
- 5,0 g d'acétate de sodium
- 2,0 g de citrate d'ammonium
- 0,20 g de sulfate de magnésium
- 0,05 sulfate de manganèse
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 15 min à 120°C.

Refroidir à 48°C et compléter avec la totalité du lyophilisat d'oxytétracycline repris dans 5 ml d'eau stérile (pour 550 ml de milieu gélosé).

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

Incubation

Incuber les boîtes à 25°C pendant 3 à 5 jours.

Lecture

Compter séparément les levures et les moisissures.

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose SB est un milieu sélectif pour le dénombrement des entérocoques.

L'azide de sodium permet d'inhiber la croissance des microorganismes à Gram négatif et le TTC (chlorure de triphényltétrazolium) est un inhibiteur de la croissance bactérienne. Il est réduit par les entérocoques en un formazan insoluble dans la cellule qui se manifeste par l'apparition d'une pigmentation rouge à marron des colonies.

Documents de références

Slanetz, L.W. et Bartley, C.H., 1957. Numbers of enterococci in water, sewage and faeces determined by the Membrane Filter Technique with an improved medium, *Journal of Bacteriology*, 74 (5), 591.

Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 41,4 g de milieu prêt à l'emploi (BK 129)

OU peser :

- 5,0 g d'extrait autolytique de levure
- 10,0 g d'extrait de viande
- 20,0 g de glucose
- 1,08 g de tween 80
- 2,0 g de phosphate dipotassique
- 5,0 g d'acétate de sodium
- 2,0 g de citrate d'ammonium
- 0,20 g de sulfate de magnésium
- 0,05 sulfate de manganèse
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 20 min à 110°C.

Refroidir à 48°C et compléter avec 10 ml de TTC 1% pour 990 ml de milieu gélosé maintenu à 48°C (5 ml si 495 ml de gélose).

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

Incubation

Incuber les boîtes à 42°C pendant 48 H.

Lecture

Compter les colonies rouges (qui réduisent le TTC) de la boîte.

GELOSE CFC : Céphalosporine Fucidine Cétrimide

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

Le milieu Céphalosporine Fucidine Cétrimide est un milieu sélectif pour l'isolement et le dénombrement des *Pseudomonas* pigmentés et non pigmentés.

La céphalosporine permet d'inhiber la majeure partie des germes contaminants et plus particulièrement les entérobactéries, les staphylocoques et les streptocoques. La fucidine inhibe le développement des *Acinetobacter / Moraxella* sans intervenir sur la croissance des *Pseudomonas*. Les levures contaminantes sont inhibées par le cétrimide. Ces trois composés sont apportés extemporanément.

Documents de références

NF V 04-504, 1988. Viande et produits à base de viande. Dénombrement des *Pseudomonas*.

Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 24,7 g de milieu prêt à l'emploi (BK 118)

OU peser :

- 16,0 g de peptone pancréatique de gélatine
- 10,0 g de tryptone
- 10,0 g de sulfate de potassium
- 1,4 g de chlorure de magnésium
- 12,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 15 mins à 120°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec la totalité du lyophilisat de supplément sélectif (BS 02208) replit dans 5 ml d'eau stérile.

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

Incubation

Incuber les boîtes à 25°C pendant 48 à 72 heures.

Lecture

Dénombrer les colonies pigmentées et fluorescentes.

GELOSE PCA-lait additionné d'inhibiteurs de bactéries à Gram positif

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

Le milieu PCA-lait (Plate Count Agar + lait) est utilisé pour le dénombrement des micro-organismes de la flore mésophile aérobie revivifiable (FMAR) des produits laitiers. L'ajout de cristal violet et d'antibiotique, tel que la vancomycine, permet d'éliminer la flore Gram positif.

Les différents constituants du milieu permettent une meilleure croissance des microorganismes à dénombrer. Le cristal violet inhibe le développement de la flore Gram positif. De même la vancomycine agit contre les microorganismes à Gram positif tels que les staphylocoques, les pneumocoques, les streptocoques, *Listeria monocytogenes*, *Corynebacterium* et les entérocoques.

Documents de références

FIL-IDF 100B, 1991

Préparation

Pour 1 L de milieu peser :

- 20,5 g de PCA prêt à l'emploi
- 3,0 g d'agar agar bactériologique

Répartir en flacon à raison de 495 ml/ flacon

Autoclaver le milieu obtenu 20 mins à 120°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec 5 ml de lait écrémé reconstitué stérile (10% : 10g de poudre/ 100 ml d'eau), 0,25 ml de solution de cristal violet (1% : 10mg/ml) et 0,5 ml de solution de vancomycine (0,5% : 5mg/ml).

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

Incubation

Incuber les boîtes à 30°C pendant 3 jours.

Lecture

Compter toutes les colonies.

GELOSE VRBG : gélose Glucosée au cristal Violet et au Rouge neutre

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose VRBG est utilisée pour la recherche et le dénombrement des entérobactéries dans les produits laitiers et autres produits alimentaire.

La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaries assure l'inhibition des bactéries non recherchées. La dégradation du glucose en acide est révélée par le virage au rouge de l'indicateur de pH : le rouge neutre.

Documents de références

NF V 08-021. Décembre 1985. Directives générales pour le dénombrement sans revivification des *Enterobacteriaceae*. Technique NPP et méthode par comptage des colonies.

Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 39,5 g de milieu prêt à l'emploi (BK 011)

OU peser :

- 7,0 g de peptone pepsique de viande
- 3,0 g d'extrait autolytique de levure
- 10,0 g de glucose
- 1,5 g de sels biliaries
- 5,0 g de chlorure de sodium
- 0,030 g de rouge neutre
- 0,002 g de cristal violet
- 13,0 g d'agar agar bactériologique

Porter à ébullition lentement, jusqu'à dissolution complète des poudres, dans un bain marie à 100°C.

Maintenir l'ébullition pendant 20 minutes.

Refroidir à 48°C. Ensemencer dans la masse (12 ml de gélose) 1 ml de produit à analyser, laisser solidifier et couler une sur-couche (4 ml de gélose).

Incubation

Incuber les boites à 30°C pendant 24 à 48 H.

Lecture

Compter les colonies rouges de plus de 1 mm de diamètre.

GÉLOSE CRBM: Cheese Ripening Bacteria Medium

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

Le milieu gélosé CRBM est utilisé pour le dénombrement des bactéries d'affinage dans son ensemble.

Les différents constituants du milieu permettent une meilleure croissance des micro-organismes à dénombrer. La piméricine et l'acide nalidixique permettent d'éliminer de la flore fongique des bactéries Gram- et des *Bacillus*.

Documents de références

Denis, C., Gueguen, M., Henry, E. et Levert, D., 2001. New media for the numeration of cheese surface bacteria, *Lait*, 81, 365-379.

Préparation

Pour 1 L de milieu peser :

- 5,0 g de KH_2PO_4
- 33,4 g de lactate de sodium à 60%
- 2,0 g de $\text{Mg SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
- 10,0 g de tryptone
- 7,0 g d'extrait de levure
- 50,0 g de NaCl
- 1,0 g de Tween 80
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Ajuster le pH à 7,3

Répartir en flacon à raison de 495 ml/ flacon

Autoclaver le milieu obtenu 15 min à 120°C.

Refroidir à 48°C et supplémenter avec 0,5 ml de solution de piméricine (1,8% : 1,8 g dans 100 ml d'eau stérile) et 5 ml d'acide nalidixique (0,4% : 0,4 g d'acide nalidixique dans 100 ml de DMSO).

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

Incubation

Incuber les boîtes à 25°C pendant 5 jours puis 10 jours environ à température ambiante.

Lecture

Compter toutes les colonies à 5 jours puis à 10 jours.

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose FH est utilisée pour le dénombrement des lactobacilles mésophiles hétérofermentaires facultatifs.

Documents de références

Isolini, D., Grand, M. et Glättli, H., 1990. Selektivmedien zum Nachweis von obligat und fakultativ heterofermentativen Laktobazillen, *Schweiz. Milchw. Forschung*, 19 (3), 57-59.

Préparation

Préparation du tampon acétate (1M, pH : 5,40) :

- 151,3 g d'acétate de sodium trihydrate
- 11,9 g d'acide acétique 100% (ou 11,3 ml)
- 1000 g d'eau déminéralisée

Pour 1 L de milieu peser :

- 10,0 g de peptone pancréatique de caséine
- 10,0 g d'extrait de viande
- 1,0 g d'extrait de levure
- 20,0 g de mannitol
- 0,1 g de Mg SO₄, H₂O
- 0,1 g de Mg SO₄, 7H₂O
- 3,0 g de Tween 80
- 15,0 g d'agar agar bactériologique
- 200 ml de tampon acétate

Autoclaver le milieu obtenu 15 min à 120°C.

Refroidir à 48°C et compléter avec 10 ml de solution de vancomycine à 5 g/L (soit 0,25 g dans 50 ml d'eau).

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

Incubation

Incuber les boîtes à 30°C pendant 72 heures en anaérobiose.

Lecture

Compter toutes les colonies.

GÉLOSE MSE : Mayeux Sandine et Elliker

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

La gélose MSE est un milieu sélectif permettant la recherche et le dénombrement des *Leuconostocs* dans le lait, les produits laitiers et les aliments sucrés.

A partir du saccharose du milieu, *Leuconostoc mesenteroides* et *Leuconostoc dextranicum* synthétisent des polysaccharides (dextranes) qui donnent aux colonies un aspect gélatineux.

Documents de références

Mayeux, J.V., Sandine, W.E. et Elliker, P.R., 1962. Aselective medium for detecting *Leuconostoc* in mixed-strain starter cultures, *Journal of Dairy Science*, 45, 655.

Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 138,5 g de milieu prêt à l'emploi (BK 087)

OU peser :

- 10,0 g de tryptone
- 2,5 g de gélatine
- 5,0 g d'extrait autolytique de levure
- 100,0 g de saccharose
- 5,0 g de glucose
- 1,0 g de citrate d'ammonium
- 0,075 g d'azide de sodium
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 20 mins à 110°C.

Refroidir à 48°C et couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

Incubation

Incuber les boîtes à 30°C pendant 48 à 72 h.

Lecture

Compter toutes les colonies de la boîte en distinguant les dextrane+ (gélatineuses) et les dextranes-.

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

Le milieu RPF permet la détection et la numération directe des staphylocoques à coagulase + dans les prélèvements biologiques, les produits alimentaires et les produits laitiers.

La croissance des staphylocoques est favorisée par le pyruvate de sodium et la glycine. La microflore secondaire est inhibée en présence de chlorure de lithium, de tellurite de potassium (ajouté extemporanément), ainsi que par la forte concentration en glycine. Les *Staphylococcus aureus* se caractérisent par la présence de colonies noires par réduction du tellurite en tellure et sont entourées d'un halo d'éclaircissement du plasma.

Documents de références

Baird Parker, A.C., 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci, *Journal of Applied Bacteriology*, 25, 12-19.

De Buyser, M.L., Lambard, B., Schulten, S.M., In't Veld, P.H., Scotter, S.L., Rollier, P., Lahellec, C., 2003. Validation of EN ISO standard methods 6888 Part 1 and Part 2 : 1999 -- Enumeration of coagulase-positive staphylococci in foods, *International Journal of Food Microbiology*, 83 (2), 185-194.

Préparation

Pour 1 L de milieu :

- 52,2 g de milieu prêt à l'emploi (BK 055 HA : Baird-Parker)

OU peser :

- 10,0 g de tryptone
- 5,0 g d'extrait de viande
- 1,0 g d'extrait autolytique de levure
- 10,0 g pyruvate de sodium
- 12,0 g de glycine
- 5,0 g de chlorure de lithium
- 15,0 g d'agar agar bactériologique

Autoclaver le milieu obtenu 15 mins à 121°C.

Refroidir à 48°C et compléter avec la totalité de 10 flacons de lyophilisat de supplément sélectif (BS 03408) replit dans 10 ml d'eau stérile/flacon.

Couler environ 15 ml de milieu par boîte de Pétri ; laisser solidifier sur une surface froide.

Incubation

Incuber les boîtes à 37°C pendant 48 heures.

Lecture

Staphylococcus aureus se caractérise par la formation de colonies noires, brillantes, convexes, entourées d'un halo d'éclaircissement du plasma. Les staphylocoques à coagulase – sont presque totalement inhibés ; toutefois si une culture apparaît, les zones d'éclaircissement sont absentes.

Dénombrer toutes les colonies en séparant celles qui présentent un halo d'éclaircissement.

Objet, domaine d'application et Principe de la méthode

Le milieu gélosé de Turner est utilisé pour le dénombrement des lactocoques.

Documents de références

Turner, N., Sandne, P. R.E and Day, A. (1963). Use of tetrazolium dyes in an agar medium for differentiation of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. *Journal of Dairy Science* **46**,380-385.

Réactifs (chimiques et biologiques)

- eau distillée ou déminéralisée
- T.T.C. (Chlorure de triphényltétrazolium) à 1% dans de l'eau stérile
- acide nalidixique à 0,4 % : 0,4 g d'acide nalidixique dans 100ml de DMSO (ref Prolabo 23500297)
- le mélange de réactifs suivants pour 1 L de milieu :
 - tryptone 5,0 g
 - extrait de levure 5,0 g
 - L.arginine HCl 3,0 g
 - glucose 0,5 g
 - KH₂PO₄ 2,0 g

1. Contenu du mode opératoire

- Pour 1 litre d'eau distillée, peser chacun des ingrédients du mélange décrit puis ajouter l'eau.
- Répartir en flacons à raison de 493 mL par flacon.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.
- Refroidir et maintenir le milieu à 48°C.
- Ajouter 2,5 mL de T.T.C 1 % et 5 mL d'acide nalidixique à 0,4 % aux 493 mL de gélose maintenue à 48°C.
- Couler aseptiquement ce milieu gélosé dans les boîtes de Pétri
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Après ensemencement, incuber à 30°C pendant 72 heures
- Lecture : compter d'une part les colonies rouges de *Lactococcus lactis* et d'autre part les colonies roses de *Lactococcus cremoris*

ANNEXE 2

Composition des bouillons de cultures (Milieu TS)

Objectif

L'objectif de la préparation de ce bouillon est de vérifier l'inhibition de *S. aureus* en milieu tamponné à pH 6,8 par des souches de bactérie lactique inhibitrices à la croissance de *S. aureus* dans le lait.

Préparation

La composition du milieu TS est la même de celle de TSB-YE sauf qu'il n'y a pas de sucre dans le milieu TS.

Pour **1 L** de bouillon de culture TS peser :

- 17,0 g de tryptone
- 3,0 g de peptone
- 6,0 g d'extrait autolytique de levure
- 2,5 g Phosphate dipotassique (K_2HPO_4)
- 5,0 g de chlorure de sodium

Stérilisation à 120 °C pendant 10 min

PH de milieu 7,2

*le milieu a été préparé en double concentration parce que le milieu a été ajusté à pH 6,8 par des tampons phosphate.

(Milieu TPYC)

Introduction

Le niveau de *S. aureus* dans le bouillon de culture TS est inférieur de celui dans le lait microfiltré. A cause de cette différence entre ces deux niveaux, plusieurs bouillons de culture et plusieurs essais sont effectués pour développer un milieu de culture dans le quel le développement de *S. aureus* est similaire de celui dans le lait.

Objectif

Les objectifs de la préparation de ce bouillon sont:

- 1) d'avoir un comportement de *S. aureus* dans ce bouillon similaire à celui dans le lait microfiltré en culture seule ou en co-culture avec *L. garvieae*.
- 2) éviter l'acidification par *L. garvieae* pour être capable d'étudier l'effet de pH, de température sur l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*.

Préparation

Pour 1 L de bouillon de culture TPYC peser :

- 17,0 g de tryptone
- 3,0 g de peptone
- 6,0 g d'extrait autolytique de levure
- 15,0 g de caséine

Stérilisation à 110 °C pendant 10 min

PH de milieu 7,0

Application

- Le milieu est utilisé pour étudier l'effet de pH, de température sur l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*.
- Le milieu est utilisé pour étudier l'effet de la température, du pH et des teneurs en acide lactique D et en acide lactique L sur le comportement de *L. monocytogenes* (Thèse Marjorie SAUBUSSE).

ANNEXE 3: Composition du tampon phosphate à 0,1 M

Solution A: KH_2PO_4 à 0,1 M

Solution B: K_2HPO_4 à 0,1 M

pH	5	5,4	6	6,5	6,8	7,5
Solution A	988	967	877	627	465	132
Solution B	12	33	123	373	534	863

Après leur préparation, les tampons sont stérilisés par filtration sur membrane d'acétate de cellulose.

Annexe 4: Evolution de Staphylococcus coagulase positive (SC+), flores bacteriennes, pH et l'extrait sec dans les fromages de quatre exploitations

	Temps	<i>Staphylococcus coagulase+</i>				Dénombrement sur le milieu															
		SC+		delta		M17		MSE+		Turner		SB		VRBG		FH		pH		ES%	
		X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S	X	S
EX1	0 h	1,61	0,00			2,31	0,99	1,70	0,13	0,00	0,00	0,66	0,93	0,41	0,57	1,23	0,35	6,56	0,01	12,13	0,54
EX2	0 h	2,57	0,39			3,28	0,57	1,76	0,21	1,27	1,80	1,88	0,38	1,50	0,92	2,63	0,13	6,53	0,01	12,04	0,80
EX3	0 h	1,81	0,71			4,02	0,37	1,55	0,34	1,47	2,08	1,70	0,13	0,65	0,49	2,24	0,19	6,55	0,00	11,64	0,16
EX4	0 h	2,58	0,13			3,35	0,28	0,00	0,00	1,63	2,31	1,81	0,28	0,54	0,76	1,47	0,06	6,60	0,01	11,85	0,21
EX1	3 h	2,81	0,28	0,20	0,28	7,22	0,23	3,82	0,81	2,75	0,62	2,76	0,64	1,70	0,99	2,26	0,30	6,49	0,05	37,05	3,80
EX2	3 h	4,48	0,33	0,92	0,71	7,07	0,19	3,86	0,64	3,61	0,45	3,33	0,17	2,00	1,41	3,32	0,42	6,41	0,06	39,60	0,14
EX3	3 h	3,45	1,19	0,64	0,48	7,09	0,11	4,09	1,75	4,77	1,94	3,84	0,36	2,82	1,43	3,91	0,55	6,47	0,01	40,60	0,24
EX4	3 h	4,53	0,13	0,96	0,01	6,01	1,97	1,16	1,63	4,39	1,17	3,59	0,04	1,70	0,98	2,21	0,29	6,47	0,02	42,03	2,22
EX1	6 h	4,33	0,43	1,52	0,15	8,82	0,28	4,36	0,37	4,56	0,36	4,36	0,74	4,39	1,75	2,67	0,20	5,74	0,19	47,42	0,57
EX2	6 h	5,27	0,21	0,79	0,53	8,40	0,21	4,53	0,54	4,74	0,07	4,78	0,10	3,60	1,24	3,80	0,09	5,91	0,23	46,67	0,33
EX3	6 h	4,74	1,14	1,29	0,05	9,04	0,44	4,61	1,00	6,35	0,73	4,78	0,73	4,11	0,04	3,94	0,23	5,41	0,05	49,38	0,28
EX4	6 h	5,05	0,13	0,52	0,01	7,31	1,51	2,81	0,71	5,44	1,14	4,74	0,25	4,34	1,75	2,56	0,13	5,68	0,16	47,30	0,01
EX1	24 h	4,55	0,24	0,23	0,19	9,08	0,08	4,98	0,40	5,36	0,06	4,71	0,53	4,68	1,64	2,91	0,01	5,36	0,06	49,87	0,44
EX2	24 h	5,96	0,66	0,69	0,86	8,75	0,02	4,93	0,52	6,47	1,10	5,72	0,25	5,02	0,74	4,61	0,18	5,30	0,01	50,01	0,63
EX3	24 h	4,72	1,03	-0,02	0,11	9,17	0,37	5,75	0,18	6,30	0,86	5,19	0,18	4,27	1,05	4,51	0,35	5,22	0,06	51,79	0,18
EX4	24 h	5,19	0,18	0,14	0,31	7,90	0,76	4,27	0,95	6,85	1,14	5,02	0,09	4,09	0,34	3,54	0,29	5,32	0,04	51,73	1,23
EX1	8 J	4,76	0,35	0,21	0,11	9,45	0,26	6,00	2,47	5,95	0,22	4,66	0,62	4,41	1,42	3,04	1,20	5,26	0,01	50,18	1,24
EX2	8 J	5,90	0,81	-0,06	0,15	8,66	0,08	6,50	0,64	6,98	0,74	6,42	1,41	5,28	0,23	5,80	0,28	5,29	0,00	50,77	1,95
EX3	8 J	4,63	1,34	-0,09	0,31	9,24	0,07	6,04	0,04	7,66	0,95	4,92	0,42	3,93	0,35	5,60	0,57	5,17	0,08	51,52	0,54
EX4	8 J	5,51	0,18	0,33	0,36	7,06	0,68	6,10	0,43	7,08	1,03	5,44	0,45	3,79	0,47	5,43	0,49	5,28	0,05	52,66	1,43
EX1	28 J	4,32	0,56	-0,08	0,08	9,03	0,28	6,33	0,66	5,25	1,90	4,98	0,06	3,55	0,62	5,69	0,43	5,27	0,03	54,77	4,15
EX2	28 J	5,82	0,72	-0,08	0,30	8,77	0,48	7,04	0,03	6,69	0,45	5,96	0,11	5,83	1,11	7,79	0,22	5,16	0,06	52,67	2,50
EX3	28 J	4,55	1,04	-0,22	0,40	9,14	0,20	5,98	1,17	7,50	1,63	5,46	0,12	4,33	1,94	7,92	0,50	5,13	0,09	53,60	1,41
EX4	28 J	5,30	0,22	-0,29	0,02	7,31	0,45	6,62	0,55	7,43	0,59	5,63	0,68	4,60	0,98	7,63	0,83	5,29	0,07	52,07	0,45

M17= flore cultivable sur milieu M17, MSE + = *Leuconostoc dextrane*+, MSE-= *Leuconostocs* et flore lactique, Turner= flore cultivable sur milieu Turner (Colonie rouge),

SB= *Enterococcus*, VRBG= Entérobactérie, FH= *Lactobacillus*, ES % = extrait sec en %.

EX1= Exploitation 1; EX2= Exploitation 2; EX3= Exploitation 3 ; EX4= Exploitation 4.

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Régine TALON, Directeur de Recherche, INRA, Saint-Genès-Champanelle

Monsieur Eric BEUVIER, Ingénieur de Recherche, INRA, Poligny

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur ALOMAR Jomaa

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE
LORRAINE, une thèse intitulée :

"Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae*
pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère"

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés biotechnologiques et alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 24 août 2007

Le Président de l'I.N.P.L.

F. LAURENT



Etude de propriétés physiologiques de *Lactococcus lactis* et *Lactococcus garvieae* pour la maîtrise de *Staphylococcus aureus* en technologie fromagère

Résumé

La législation européenne impose la recherche d'entérotoxines staphylococciques dans les fromages si le niveau de *S. aureus* est supérieur à 10^5 ufc/g. Dans cette optique, l'objectif de cette thèse était de fournir des éléments scientifiques pour contrôler *S. aureus* par biopreservation. Dans un premier temps, la croissance de *S. aureus* a été suivie dans des fromages fermiers AOC Saint-nectaire. Dans ces fromages les populations de *S. aureus* se multiplient essentiellement durant les six premières heures de fabrication pour atteindre un maximum à 24 h. En fromages au lait cru, leur croissance et leur niveau maximal dépendraient de la concentration initiale dans le lait, du pH (en particulier pH à 6 h), de la température, mais le rôle des communautés microbiennes n'a pas pu être mis en évidence. Dans un deuxième temps, les capacités inhibitrices de souches de *Lactococcus lactis* et de *Lactococcus garvieae* ont été évaluées en lait microfiltré. *L. lactis* subsp. *lactis* inhiberait la croissance de *S. aureus* par abaissement du pH mais aussi par production d' H_2O_2 pour certaines souches. Par contre, le pH ne serait pas responsable de l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae*. La compétition pour des acides aminés ne semblerait pas impliquée dans l'inhibition par *L. lactis* puisque cette espèce en synthétise de grande quantité en lait. Même si la thréonine, la phénylalanine, la méthionine, l'isoleucine et la valine deviennent limitants dans la co-culture de *S. aureus* avec *L. garvieae*, cette carence ne serait pas responsable de l'inhibition puisque leur ajout ne lève pas l'inhibition. Cependant du peroxyde d'hydrogène (3 mmol/l) produit par *L. garvieae* en co-culture en milieu BHI serait responsable de l'inhibition. En milieu de laboratoire, l'inhibition de *S. aureus* par *L. garvieae* est effective durant les premières heures de culture et diminue en cours d'incubation. Elle augmente avec la concentration de *L. garvieae*. Elle est plus forte à 24°C qu'à 30°C. Le rôle de la catalase de *S. aureus* dans l'interaction avec *L. garvieae* reste à préciser.

Mots clés: *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, fromage, inhibition, peroxyde d'hydrogène.

Study of physiological properties of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* for the control of *Staphylococcus aureus* in cheese technology

Summary

The European legislation imposes the staphylococcal search for enterotoxins in cheeses if the level of *S. aureus* is higher than 10^5 ufc/g. Accordingly, the objective of this thesis was to provide scientific data to control *S. aureus* by biopreservation. In a first, the growth of *S. aureus* was monitored in farm cheeses AOC Saint-Nectaire. In these cheeses the populations of *S. aureus* multiplied mainly during the first six hours of manufacture to reach a maximum to 24 h. Their growth and their maximum level would depend on the initial concentration in milk, on the pH (in particular pH at 6 h), on the temperature, but the role of the microbial communities could not be highlighted. In the second step, the inhibiting capacities of strains of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* were evaluated in microfiltrated milk. *L. lactis* subsp. *lactis* would inhibit the growth of *S. aureus* by lowering the pH but also by the production of H_2O_2 for certain strain. On the other hand, the pH would not be responsible for the inhibition of *S. aureus* by *L. garvieae*. The competition for amino acids does not seem to be implied in inhibition by *L. lactis* since this species synthesis a great amount in milk. Even if threonine, phenylalanine, methionine, isoleucine and valin become limiting in the co-culture of *S. aureus* with *L. garvieae*, this would not be responsible for inhibition since their addition in milk does not raise inhibition. In laboratory medium the inhibition of *S. aureus* by *L. garvieae* was effective during the first hours of culture and decreases during incubation. It increased with the concentrations of *L. garvieae*. It was stronger at 24°C than at 30°C. It would be due to hydrogen peroxide (3 mmol/l) produced by *L. garvieae* in Co-culture in medium BHI. The role of the catalase of *S. aureus* in the interaction with *L. garvieae* remains to be specified.

Key-words: *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis*, cheese, inhibition, hydrogen peroxide.