



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *Université Toulouse III - Paul Sabatier*
Discipline ou spécialité : *Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition*

Présentée et soutenue par *Hélène TORMO*
Le *Mardi 21 Décembre 2010*

Titre : *DIVERSITE DES FLORES MICROBIENNES DES LAITS CRUS DE CHEVRE ET
FACTEURS DE VARIABILITE*

JURY

Mme Nathalie Desmasures (Professeur, Université de Caen)
M. Eric Beuvier (Directeur de recherche, INRA Poligny)
Mme Corine Bayourte (Professeur, ENSAT)
Mme Nathalie Gontard (Professeur, SupAgro)
Mme Valérie Michel (Pôle Sécurité Sanitaire, ACTILAIT)

Ecole doctorale : *Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)*

Unité de recherche :

Directeur(s) de Thèse :

Mme Christine Roques (Professeur, Université Paul Sabatier) - Directrice de thèse
Mme Djamila Lekhal (Professeur, Ecole d'Ingénieurs de Purpan) - Co-encadrante de thèse
Rapporteurs : *Mme Nathalie Desmasures, M. Eric Beuvier*

Thèse
Pour obtenir le diplôme de :
Docteur de l'Université Paul Sabatier Toulouse 3
Spécialité : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Hélène TORMO

DIVERSITE DES FLORES
MICROBIENNES DES LAITS CRUS
DE CHEVRE ET
FACTEURS DE VARIABILITE

SOUTENANCE LE 21 Décembre 2010 DEVANT LE JURY :

Mme Nathalie Desmasures (Professeur, Université de Caen, Basse Normandie), Rapporteur

M. Eric Beuvier (Directeur de recherche, INRA Poligny), Rapporteur

Mme Christine Roques (Professeur, Université Paul Sabatier), Directrice de thèse

Mme Djamila Lekhal (Professeur, Ecole d'Ingénieurs de Purpan), Co-encadrante de thèse

Mme Corine Bayourthe (Professeur, ENSAT), Examinatrice

Mme Nathalie Gontard (Professeur, Supagro), Examinatrice

Mme Valérie Michel (Pôle Sécurité Sanitaire, ACTILAIT), Examinatrice

Sommaire

Remerciements.....	7
Résumé.....	9
Abstract.....	10
Les Tableaux (Chapitres I et II).....	11
Les figures (Chapitre I et II).....	13
INTRODUCTION.....	15
CHAPITRE I -ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES ET PROBLEMATIQUE.....	21
1 - RAPPEL SUR LA TECHNOLOGIE FROMAGERE.....	23
1.1. Les étapes de fabrication d'un fromage.....	23
1.2. La technologie lactique.....	24
2 - NATURE ET ROLE DE LA MICROFLORE DES LAITS CRUS.....	25
2.1. La microflore utile ou d'intérêt technologique.....	26
2.2. La microflore indésirable et potentiellement pathogène.....	44
3 - IMPORTANCE ET DIVERSITE DES MICROFLORES DES LAITS CRUS.....	49
3.1. La microflore totale.....	50
3.2. Les microflores d'intérêts technologiques et les microflores d'altération.....	50
3.3. Diversité des microorganismes du lait.....	52
3.4. Effet de la saison sur les niveaux de microflores des laits.....	52
4 - LES RESERVOIRS DE MICROFLORES DES LAITS CRUS.....	55
4.1 Les trayons.....	55
4.2. L'environnement des animaux.....	59
4.3. La machine à traire.....	63
5 - INFLUENCE DE COMBINAISONS DE PRATIQUES SUR LA COMPOSITION MICROBIENNE DES LAITS.....	67
5.1. Combinaisons de pratiques et importance des groupes microbiens.....	67
5.2. Combinaisons de pratiques et diversité des espèces microbiennes.....	69
Synthèse de la bibliographie.....	71
6 - OBJECTIF DE LA THESE.....	72
CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES.....	75
1 - CHOIX DES EXPLOITATIONS ET DE LA SAISON.....	77
2 - ENQUETES, OBSERVATIONS EN ELEVAGE.....	77
3 - PRELEVEMENT DES LAITS ET CONDITIONS DE STOCKAGE.....	78
4 - ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES ECHANTILLONS.....	80

5 - TRAITEMENT DES DONNEES	81
5.1. Effet de la saison sur l'importance des différents groupes microbiens dénombrés.....	81
5.2. Effet des conditions d'élevage sur les profils microbiens des laits	81
5.3. Effet des conditions d'élevage sur les espèces bactériennes majoritaires des laits	82
5.4. Effet des conditions d'élevage sur les espèces majoritaires de bactéries lactiques mésophiles.....	84
CHAPITRE III - VARIABILITÉ DES GROUPES MICROBIENS DES LAITS DANS LES ÉLEVAGES ET IMPACT DE LA SAISON ET DES CONDITIONS D'ÉLEVAGE	85
1 - INTRODUCTION.....	86
2 - PUBLICATION	87
ABSTRACT.....	89
INTRODUCTION	90
MATERIAL AND METHODS	91
RESULTS	95
DISCUSSION	99
CONCLUSION.....	101
Références.....	102
Tables and figures	107
CHAPITRE IV - DIVERSITÉ DES ESPÈCES BACTÉRIENNES MAJORITAIRES DES LAITS CRUS ET INFLUENCE DES CONDITIONS D'ÉLEVAGE	125
1 - INTRODUCTION.....	126
2 - PUBLICATION	127
ABSTRACT.....	129
INTRODUCTION	130
MATERIAL AND METHODS	131
RESULTS	134
DISCUSSION	138
CONCLUSION.....	140
References.....	142
Tables et figures	147
CHAPITRE V- CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET GÉNOTYPIQUE DES BACTÉRIES LACTIQUES ISOLÉES DE LAIT DE CHÈVRE ET INFLUENCE DES CARACTÉRISTIQUES D'ÉLEVAGE SUR LES ESPÈCES DOMINANTES	157
1 - INTRODUCTION.....	158

3 - PUBLICATION	160
ABSTRACT.....	162
INTRODUCTION	163
MATERIAL AND METHODS	164
RESULTS	167
DISCUSSION	170
References	173
Tables and figures	177
CHAPITRE VI - DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	191
Valorisation du travail de thèse	201
Références bibliographiques	205
Annexes.....	238

Remerciements

Pour sa confiance et l'attention avec laquelle elle a suivi l'évolution de ce travail, je tiens à remercier Christine Roques, Professeur de microbiologie et virologie à l'université de Toulouse et Directrice de ma thèse.

Je souhaite témoigner toute ma reconnaissance à Djamila Lekhal, Directrice du Département Agriculture et Agro-alimentaire de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan, co-encadrante de cette thèse pour ses conseils avisés et la rigueur avec laquelle elle a encadré ce travail. Quelle soit assurée de toute ma gratitude pour m'avoir permis de terminer ce travail dans les meilleures conditions.

Je remercie Madame Nathalie Desmases, Professeur à l'université de Caen, ainsi que Monsieur Eric Beuvier, Directeur de recherche en Technologie et Analyses Laitières à l'INRA de Poligny, pour nous avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Madame Corine Bayourthe, Professeur à l'ENSA de Toulouse , Madame Valérie Michel, responsable du pôle sanitaire d'ACTILAIT, ainsi que Madame Nathalie Gontard, Professeur à Supagro-Montpellier, pour avoir accepté d'être membre du jury.

Je souhaite remercier Carlos Lopez, responsable du service biométrie de l'Institut de l'Elevage, pour l'encadrement de mon travail concernant le traitement statistique des données.

Je tiens à remercier Madame Agnès Delacroix-Buchet, Docteur en Sciences Agronomiques, INRA de Jouy en Josas, ainsi que Jean-Claude Ogier, Ingénieur d'études, pour m'avoir accueilli au laboratoire de microbiologie de l'INRA de Jouy en Josas pour la réalisation d'analyses des laits par les méthodes PCR-TTGE et PCR-DGGE.

Mes remerciements vont également à Monsieur Yann Demarigny, Enseignant-Chercheur à l'ISARA-Lyon, qui m'a accueilli au sein du laboratoire de microbiologie et initié aux techniques SDS Page et Rep-PCR.

Je remercie tous les membres du comité de pilotage pour le suivi de mon travail et leurs conseils : Mesdames : Claire Agabriel, Professeur de l'Enseignement Supérieur Agricole, VetAgro Sup, Clermont Ferrand, Marie-Christine Montel, Directrice de recherche à l'INRA d'Aurillac, Yvette Bouton, chargée de recherche au Comité Interprofessionnel du Gruyère de Comté, Cécile Laithier, Chef de projet-animatrice à l'Institut de l'Elevage, Valérie Michel, responsable du pôle sanitaire d'ACTILAIT et Monsieur : Yann Demarigny, Enseignant-Chercheur à l'ISARA-Lyon.

Je tiens à remercier tout particulièrement Melles Céline Arliguié et Christelle Couderc, techniciennes du laboratoire de microbiologie de l'Ecole d'Ingénieurs de Purpan pour leur implication dans le cadre de cette thèse.

Je remercie également l'ensemble des étudiants pour leur contribution à la réalisation de cette étude : Mesdemoiselles Fanny Pelissier, Claire Vergez, Delphine Connan, ainsi que Monsieur Florian Coedel.

Pour ceux que je n'ai pas cités mais qui se reconnaîtront, j'exprime toute ma gratitude pour leur soutien, les moments de partage et d'amitiés.

« Le monde du partage devra remplacer le partage du monde »

Claude Lelouch

Extrait de : *Itinéraire d'un enfant gâté*

Résumé

Les flores microbiennes des laits crus ont un rôle déterminant sur la qualité technologique et sensorielle des fromages au lait cru. Des études portant sur le lait de vache montrent que la saison et certaines conditions d'élevage peuvent influencer sur les niveaux et les équilibres de ces microflore. En lait cru de chèvre, peu de données existent sur ce sujet. Cette étude porte sur (i) l'évaluation des grands groupes microbiens, des espèces bactériennes majoritaires des laits crus de chèvre par des approches culture dépendante et culture indépendante (ii) la connaissance de certains facteurs de variabilité dont les conditions d'élevage et la saison (printemps 2006, hiver 2007), pour des exploitations fromagères fermières issues de zones géographique différentes. Les microflore majoritaires sont par ordre d'importance décroissante : les staphylocoques à coagulase négative, les microcoques et corynébactéries (*Arthrobacter* spp., *Brevibacterium linens*), les bactéries lactiques (*Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc* spp., *Enterococcus faecium*), les coliformes (*Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Raoulterra planticola*). L'analyse statistique des facteurs explicatifs de la variabilité des flores microbiennes des laits a mis en évidence l'effet de la saison et de certaines conditions d'élevage. La nature de la litière, les conditions d'ambiance de la zone où la traite est effectuée, l'hygiène autour de la traite, ainsi que l'attention portée au suivi sanitaire des animaux, sont les principaux facteurs qui pourraient expliquer les différences d'importance et de répartition des groupes et des espèces bactériennes dans les laits crus de chèvre. Ce travail montre qu'il est possible à travers un choix judicieux de pratiques, d'obtenir un lait de bonne qualité sanitaire où les flores microbiennes d'intérêts technologiques sont dominantes (bactéries lactiques, microcoques et bactéries corynéformes).

Mots clés : Microorganismes, espèces bactériennes, *L. lactis*, *Enterococcus* spp, lait, chèvre, saison, conditions d'élevage, litière, machine à traire.

Abstract

The microbial flora in raw milk plays a determining role in the technological and sensory quality of raw milk cheese. Studies on cow's milk have show that the season and some farming practices can have an impact on the levels and the equilibrium of this microflora. However, there is very little data regarding raw goat's milk. This study concerns (i) the evaluation of the major microbial groups and the main bacterial species in raw goat's milk using culture dependent and culture independent methods (ii) the knowledge of some factors of variability, including farming conditions and the season (spring 2006, winter 2007), on farms producing farmhouse cheese in different geographic areas. The main microfloras in decreasing order of importance are: coagulase negative staphylococci, micrococci and corynebacteria (*Arthrobacter* spp., *Brevibacterium linens*), lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Leuconostoc* spp., *Enterococcus faecium*) and coliforms (*Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Raoulterra planticola*). The statistical analysis of the factors that can explain the variability of the microbial flora in milk has highlighted a seasonal effect as well as an effect of certain management practices. The nature of the bedding, the atmospheric conditions in the milking area, milking hygiene, as well as the attention given to animal health, are the main factors that could explain the significant differences and the distribution of bacterial groups and species in raw goat's milk. This work shows that it is possible, by making the right choices in terms of farming practices, to obtain milk of good sanitary quality in which the dominant microbial flora is of technological interest (lactic acid bacteria, micrococci and coryneform bacteria).

Key words : Microorganisms, bacteria species, *L. lactis*, *Enterococcus* spp, milk, goat, season, farm practices, bedding, milking machine.

Les Tableaux (Chapitres I et II)

Tableau 1 : Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactocoques (Dellaglio *et al.*, 1994)

Tableau 2 : Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces d'entérocoques (Dellaglio *et al.*, 1994)

Tableau 3 : Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de *Leuconostocs* (Dellaglio *et al.*, 1994)

Tableau 4 : Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactobacilles (Dellaglio *et al.*, 1994)

Tableau 5 : Classification hiérarchique des familles et genres bactériens décrits comme étant des bactéries corynéformes des fromages (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001)

Tableau 6 : Habitats des bactéries corynéformes majoritairement isolées des laits et des fromages

Tableau 7 : Habitats des espèces de *Staphylococcus*

Tableau 8 : Niveaux moyens de flores totales, de coliformes et de staphylocoques à coagulase positive pour des laits en fonction de différents pays méditerranéens (Morgan *et al.*, 2003)

Tableau 9 : Ordres de grandeur moyens (ufc.ml⁻¹) de quelques groupes microbiens couramment dénombrés dans les laits crus de vache, chèvre et brebis

Tableau 10 : Inventaire de la diversité des genres de bactéries et levures dans des laits crus de vache et de chèvre

Tableau 11 : Biodiversité spécifique des bactéries lactiques dans des laits crus de vache, chèvre, brebis d'après (1) : Bouton *et al.*, 2006 ; Dalmasso *et al.*, 2008 ; ; Rasolofo *et al.*, 2010 (2) : Badis *et al.*, 2003 ; Callon *et al.*, 2007 (3) : Caridi *et al.*, 2003 ; Feutry *et al.*, 2010a.

Tableau 12 : Variations saisonnières de quelques groupes microbiens des laits de vache (Bouton *et al.*, 2005)

Tableau 13 : Variations saisonnières des bactéries mésophiles et psychrotrophes des laits crus de vache (Vyletelya *et al.*, 2006)

Tableau 14 : Répartition des microorganismes dans les litières (ufc.g^{-1}) et les trayons de vaches (ufc/trayon) après 1 à 3 semaines d'utilisation (Rendos *et al.*, 1975)

Tableau 15 : Espèces et niveaux de flore bactérienne totale des laits issus de trois groupes de producteurs (Verdier-Metz *et al.*, 2009)

Tableau 16 : Choix des méthodes d'analyses en fonction des questions posées et échantillonnage

Les figures (Chapitre I et II)

Figure 1 : Classification des fromages selon Lenoir *et al.* (1983)

Figure 2 : Corrélation entre les niveaux d'entérocoques en surface des trayons et dans les litières (Joandel, 2007)

Fig 3 : Dénombrements effectués sur les laits UHT à la sortie de la machine à traire d'élevages caprins (Laithier *et al.*, 2004 b)

Figure 4 : Zone géographique de l'AOP Pélardon

Figure 5 : Zone géographique de l'AOP Rocamadour

Figure 6 : Délimitation du territoire de Franche-Comté

INTRODUCTION

Bien que les microorganismes soient le principal facteur de dégradation du lait, ils sont historiquement utilisés pour sa transformation et sa conservation. La fermentation des produits alimentaires comme le lait est employée depuis l'antiquité en Afrique, Asie et Europe, les premiers laits fermentés étant apparus au Moyen Orient aux alentours du XV et X^{ième} millénaire (Maurizio 1932). Ainsi, la flore microbienne du lait a très tôt été sollicitée pour ses aptitudes acidifiantes et son implication dans la formation du goût, des arômes et de la texture de nombreux produits laitiers, dont les fromages.

En France, la production de fromages s'est massivement développée pendant la première guerre mondiale et cette évolution a entraîné une standardisation progressive des fabrications, notamment sur le plan sanitaire.

La réduction des populations microbiennes du lait a donc été recherchée et, dans les années 50, les grands groupes laitiers ont commencé à pasteuriser le lait et à en remplacer les microorganismes « naturels » par des cultures aux caractéristiques connues. En France, la loi Godefroy (1969) sur le paiement du lait à la qualité a institué comme élément d'appréciation la faible charge microbienne, l'objectif prioritaire étant la réduction des microflore d'altérations et des flores pathogènes. Les conséquences directes de cette approche de la qualité sont des changements des pratiques d'élevage sous la forme de consignes relevant de pré-requis hygiéniques. Si ces pratiques ont permis d'améliorer la qualité sanitaire des laits en France, dans les années 1980, à l'heure actuelle les scientifiques s'interrogent sur l'impact de certaines pratiques d'hygiène sur les microflore d'intérêt technologique en transformation fromagère au lait cru. En effet, il est assez fréquent de retrouver des niveaux de microflore relativement bas dans les laits (moins de 5000 germes.ml⁻¹ d'après Michel *et al.*, 2005 ; Verdier-Metz *et al.*, 2009). Ces niveaux interrogent sur une éventuelle diminution de la diversité des communautés microbiennes de ces laits et sur l'impact de cette réduction sur la qualité sensorielle des fromages aux laits crus.

Le rôle prépondérant de ces microflore dans l'établissement des caractéristiques sensorielles des fromages a été démontré par de nombreuses études portant sur des technologies différentes. La suppression de la microflore du lait cru (microfiltration, pasteurisation) entraîne une diminution du goût et des différences dans les arômes des fromages (Bouton et Grappin., 1995 ; Beuvier *et al.*, 1997 ; Buchin *et al.*, 1998 ; Verdier *et al.*, 2005).

Au-delà de l'intérêt sensoriel que peuvent apporter certaines populations microbiennes des laits crus, leur effet inhibiteur vis-à-vis des microorganismes pathogènes a également été démontré (Elgazzar *et al.*, 1992 ; Gay et Amgar, 2005). Ces interactions font toujours l'objet d'études et mettent en relief l'intérêt de la biodiversité tout en révélant l'importance de l'équilibre des flores. L'étude des équilibres microbiens des laits crus de vache a été menée, pour la première fois, dans leur globalité, par Desmasures *et al.* en 1997 (a), puis, plus récemment, par Michel *et al.* (2001) et Verdier-Metz *et al.* (2009), lors d'approches par biologie moléculaire. Ces différents auteurs soulignent que les équilibres diffèrent selon les exploitations et que les conditions d'élevage et de production sont en partie à l'origine de cette variabilité. Ils démontrent, également, qu'il est possible d'obtenir des laits non dépourvus de microflore et cependant de bonne qualité sanitaire.

Les études de ce type sont rares concernant les laits de chèvre. Elles portent essentiellement sur la description de microflore dans un nombre restreint d'exploitations (Alonso-Calleja *et al.*, 2002., Foschino *et al.*, 2002., Callon *et al.*, 2007). De plus, l'étude des relations entre les conditions d'élevage et de production du lait (depuis les aires de couchage des animaux jusqu'à la production de lait) et d'autres facteurs comme la région, la saison et les équilibres microbiens des laits ne sont pas abordés.

Ce travail, réalisé au laboratoire de microbiologie de l'EI Purpan, au laboratoire de microbiologie de l'alimentation au service de la santé de l'Inra de Jouy en Josas et dans les exploitations fromagères fermières sélectionnées se propose donc :

- d'apprécier la diversité microbienne de laits de chèvre issus d'un grand nombre d'exploitations provenant de zones de production des fromages différentes. Cette diversité microbienne sera étudiée par différentes techniques d'identification selon différents niveaux de spécificités : grands groupes microbiens, espèces dominantes, sous-espèces de bactéries lactiques,
- d'étudier les liens entre cette diversité microbienne et conditions d'élevage, saison et zone géographique.

Après une présentation des données de la littérature (chapitre I), nous décrivons le matériel et les méthodes mises en œuvre pour mener à bien ce travail (Chapitre II).

Le chapitre III est consacré à la description des grands groupes microbiens des laits crus de chèvre et à l'étude des liens existants entre ces groupes et les conditions d'élevage dans deux zones géographiques (zones des AOP Rocamadour et Pélardon).

Le chapitre IV sera, lui, consacré à la description des espèces bactériennes majoritaires des laits et à l'étude de leurs liens avec les conditions d'élevage dans les deux zones géographiques.

Le Chapitre V fait l'objet d'une analyse plus spécifique des bactéries lactiques et de l'effet des conditions d'élevage sur les espèces et sous-espèces dominantes. Cette dernière partie concerne 3 zones géographiques (zones des AOP Rocamadour et Pélardon, et exploitations fromagères fermières de Franche-Comté).

Enfin, le Chapitre VI, fera la synthèse et la discussion des résultats obtenus. Des propositions de poursuite de ces travaux seront également présentées.

CHAPITRE I
ELEMENTS BIBLIOGRAPHIQUES ET
PROBLEMATIQUE

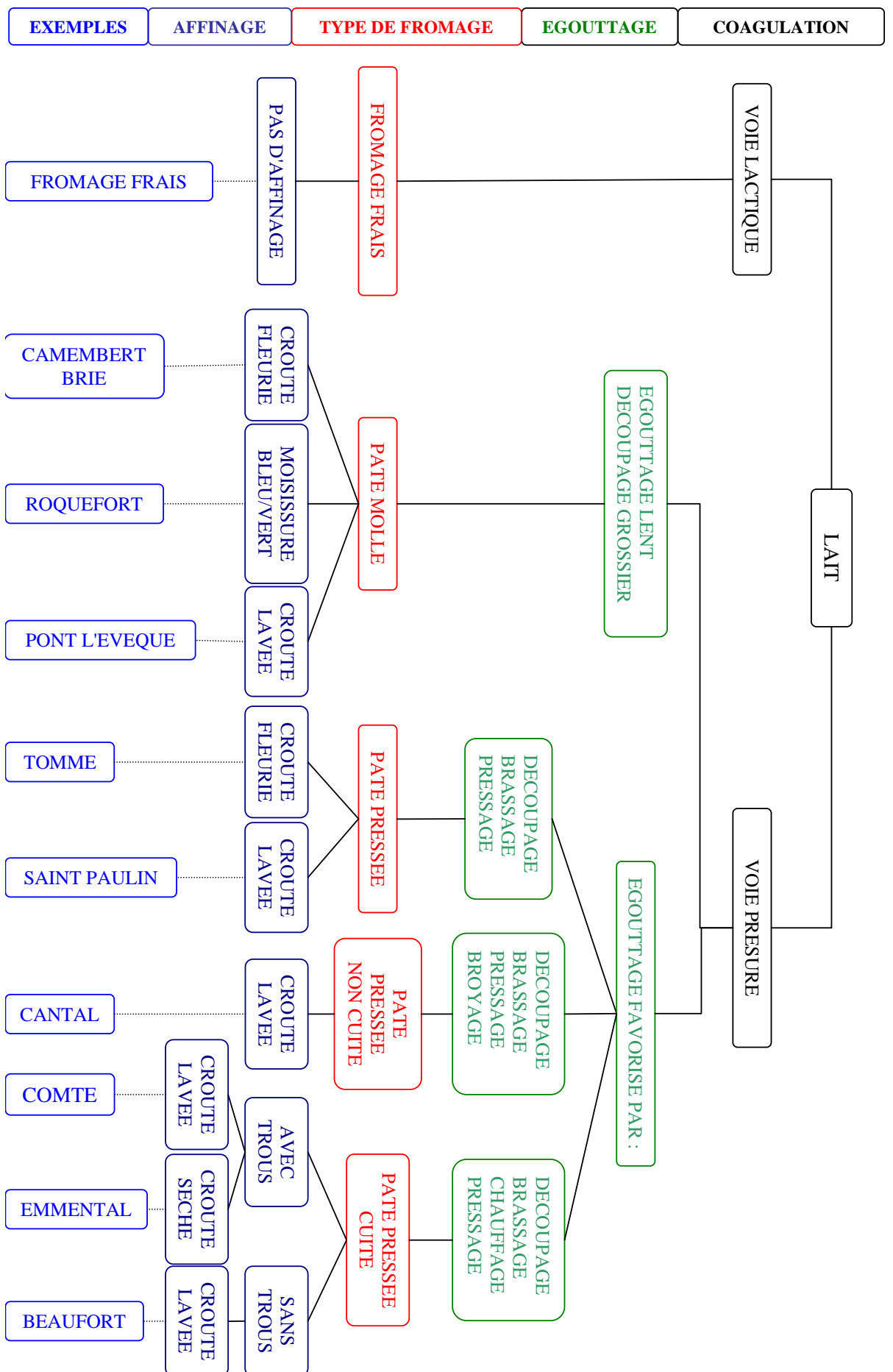


Figure 1 : Classification des fromages selon Lenoir *et al.* (1983)

Certaines flores microbiennes des laits crus participent activement à la transformation fromagère. Il nous semble donc important de rappeler au préalable les principes de la technologie fromagère. Notre étude portant par ailleurs sur des laits destinés à la fabrication de fromages de chèvre fermiers, nous aborderons plus spécifiquement la technologie de type caillé lactique.

1 - RAPPEL SUR LA TECHNOLOGIE FROMAGERE

1.1. Les étapes de fabrication d'un fromage

La fabrication d'un fromage, selon les méthodes traditionnelles comprend trois étapes successives (Mietton *et al.*, 1994) :

- **la coagulation du lait** avec formation du gel ou coagulum : formation d'un réseau protéique de caséine retenant la matière grasse et une partie de la phase aqueuse (le lactosérum). Cette coagulation se fait, pour la majorité des fromages, par voie enzymatique (chymosine contenue dans des présures animales, ou les préparations enzymatiques végétales ou microbiennes),
- **l'égouttage du gel** avec formation du caillé ou caillebotte : la phase insoluble (réseau protéique) est concentrée par acidification et synérèse,
- **l'affinage du caillé** : la caillebotte subit des transformations (enzymatiques, fermentations). A l'issue de cette étape, le fromage acquiert ses caractéristiques organoleptiques spécifiques.

A chacune des trois étapes sus-citées, des microorganismes sont impliqués. Les bactéries lactiques interviennent dès les premières étapes (coagulation, égouttage). De nombreux autres microorganismes (levures et moisissures par exemple) interviennent au cours de l'affinage et ce sont essentiellement les enzymes d'origine microbienne qui interviennent au cours de cette dernière étape.

La figure 1 reprend les étapes de fabrication de différents types de fromages. Les différences de technologies portent plus particulièrement sur le travail du caillé avant moulage (découpage, brassage, chauffage) ainsi que sur le type de croûte souhaitée (avec ou sans levures et moisissures en surface). Ce sont les conditions d'affinage (température, humidité de la salle d'affinage, soins des fromages) qui sont en partie à l'origine d'un croutage différent des fromages.

1.2. La technologie lactique

Dans le cas de la coagulation lactique, la déstabilisation proprement dite est initiée par l'ajout de présure, mais à une dose insuffisante pour l'obtention d'un coagulum ferme. C'est l'acidification du caillé qui permet la neutralisation des micelles de caséine, l'augmentation de la fermeté du gel et l'égouttage du caillé. Cette technologie est utilisée majoritairement pour les fromages de chèvre fermiers et les fromages de chèvre sous AOP (Rocamadour, Pélardon, Picodon, Selles-sur-Cher, Ste Maure de Touraine, Crottin de Chavignol, etc ...). Pour les laits de vache ou de brebis, seuls certains fromages comme le Saint Marcellin AOP par exemple (lait de vache) ou le Pérail de Brebis, sont obtenus à partir de ce procédé.

Le schéma technologique pour la production de ce type de fromage est le suivant :

- **Ensemencement en bactéries lactiques** : ces bactéries lactiques mésophiles (*L. lactis* majoritairement) permettent, avec les bactéries lactiques indigènes du lait cru, une acidification lors de la coagulation. Les micelles de caséine sont déstructurées (déméralisation) par l'acidification produite, la formation du coagulum est favorisée. Les bactéries lactiques rajoutées sont des ferments lactiques industriels, ou le lactosérum prélevé au moment du moulage de la fabrication précédente. Ce dernier est couramment utilisé en technologie fromagère fermière de type lactique. Ce lactosérum contient majoritairement des *L. lactis* (Tormo et Talliez., 2000) et contribue probablement à la spécificité des fromages fermiers car les souches qui composent ce levain sont souvent différentes selon les exploitations (Tormo et Talliez., 2000). Les sources des flores microbiennes entrant dans la composition du lactosérum et plus généralement des levains naturels complexes sont diverses. La composition de ces levains dépend des bactéries apportées par le lait cru, par l'environnement de fromagerie mais aussi de la technologie mise en œuvre (Dalmasso *et al.*, 2009).
- **Coagulation** : Une faible dose de présure est ajoutée au lait (1-2 ml pour les pâtes fraîches à 8 - 12 ml de présure à 520 mg de chymosine/L pour 100 litres de lait). Ceci entraîne la formation d'un gel de type présure, qui sera ensuite déminéralisé lors de la solubilisation des minéraux sous l'effet de l'acidification du milieu. Ce type de gel est plus ferme qu'un gel lactique pur, ce qui permet son égouttage (Mietton *et al.*, 1994). Il est important de contrôler la température du lait à l'emprésurage, qui doit être comprise entre 18 et 25 °C. Le caillage peut durer de 12 à 36 heures, le plus souvent entre 18 et 24 heures.

- **Moulage et égouttage** : Dans cette technologie, l'égouttage peut se faire intégralement en moules ou être précédé d'une phase de pré-égouttage de 1 à 12 heures en sac de toile. Au moulage, le caillé doit être lisse et ferme. L'acidité du sérum doit être comprise entre 50 et 55°D, le pH du caillé voisin de 4,4. En moule, les fromages sont retournés et salés sur une face après 6 à 7 heures d'égouttage, la température de la salle d'égouttage étant comprise entre 18 et 23°C. Après 12 à 24 heures d'égouttage total, la deuxième face du fromage est salée. Le pH du fromage est alors compris entre 4,2 et 4,4 (Institut de l'Élevage, 2008).
- **Affinage** : il commence avec l'implantation de flores de surfaces, éventuellementensemencées. Il se déroule dans une pièce dont l'ambiance est contrôlée, où la température est comprise entre 8 et 12°C, et l'hygrométrie entre 80 et 95 %. Pour les fromages de type lactique, cette étape dure généralement entre une semaine et un mois (Institut de l'Élevage, 2008).

Ainsi, en technologie lactique, les flores microbiennes du lait cru sont déterminantes non seulement pour le process de fabrication, mais également pour les caractéristiques microbiologiques du lactosérum.

2 - NATURE ET ROLE DE LA MICROFLORE DES LAITS CRUS

Les microorganismes du lait cru sont souvent abordés sous l'angle technologique. En effet, ils jouent un rôle non négligeable en transformation fromagère du lait cru et sont communément classés en microflore d'intérêt technologique, microflore d'altération, et microflore potentiellement pathogène (Richard, 1983). Toutefois, ce classement est quelque peu restrictif. Le chapitre abordant les bactéries lactiques sera particulièrement développé, ces bactéries étant plus particulièrement étudiées dans le cadre de ce travail. Les genres *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus* seront plus spécifiquement abordés. En effet, ce sont les plus fréquemment rencontrés dans les laits crus et les levains mésophiles indigènes obtenus après fermentation des laits crus de chèvre (Dalmaso, 2008).

2.1. La microflore utile ou d'intérêt technologique

2.2.1. La flore lactique

Les bactéries lactiques sont des bactéries Gram positif produisant de l'acide lactique par fermentation des glucides simples tels que le glucose et le galactose (Desmazeaud, 1992). Elles se développent généralement dans des conditions anaérobies, voire anaérobies facultatives, et jouent un rôle majeur dans l'acidification du lait et du caillé. Ce sont également des agents de l'affinage des fromages, par leurs aptitudes protéolytiques et lipolytiques (développement du goût, des arômes et de la texture). Ces bactéries lactiques sont principalement constituées de lactocoques, *Leuconostoc*, pédiocoques, streptocoques thermophiles, lactobacilles mésophiles et thermophiles, et entérocoques (Beuvier et Feutry, 2005).

Au-delà des technologies fromagères, les bactéries lactiques sont impliquées dans un grand nombre de fermentations spontanées de produits alimentaires (Stiles et Holzapfel, 1997), ce qui a conduit à la reconnaissance de leur statut « Generally Recognized As Safe », excepté pour les entérocoques (Klaenhammer *et al.*, 2005). Les bactéries lactiques ont un rôle fondamental dans les équilibres microbiens du lait. Ainsi, leur développement excessif ou insuffisant peut induire des défauts de texture et de goût des fromages. Elles constituent un moyen biologique efficace pour la préservation des qualités hygiéniques des aliments, du fait de leur aptitude inhibitrice vis-à-vis des microorganismes nuisibles (Caridi *et al.*, 2003). En effet, les bactéries lactiques produisent de nombreux métabolites aux propriétés antimicrobiennes, comme des acides organiques, du peroxyde d'hydrogène, du dioxyde de carbone, de la reutérine, du diacétyle et des bactériocines (Dortu et Thonart, 2009).

Certaines bactéries lactiques ont été isolées de prélèvements pathologiques (Casalta et Montel, 2008 ; Ogier et Serror, 2008). Il s'agit, dans tous les cas, de germes opportunistes, le développement de pathologies dépendant des portes d'entrée (effraction) et de l'état de l'hôte. Normalement considérées comme non pathogènes chez le sujet sain et sans risque épidémique, elles sont classées dans le groupe 1 (OMS).

Tableau 1 : Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactocoques (Dellaglio *et al.*, 1994)

Espèces	Croissance dans / à :					Gaz à partir du glucose	Isomère de l'acide lactique	Production de :			Voges-Proskauer
	NaCl 2%	NaCl 4%	10°C	40°C	45°C			Arginine dihydrolase	α galactosidase	β galactosidase	
<i>Lc. garviae</i>		+	+	+	-	-	L(+)	+	-	-	+
<i>Lc.lactis ssp.cremoris</i>	+	-	+	-	-	-	L(+)	-	-	-	+
<i>Lc.lactis ssp.hordniae</i>	+	-	+	-		-	L(+)	+	-	-	+
<i>Lc.lactis ssp.lactis</i>		+	+	+	-	-	L(+)	+	-	-	v
<i>Lc.plantarum</i>		+	+	v	-	-	L(+)	-	v	-	+
<i>Lc.raffinolactis</i>		-	+	-		-	L(+)	v	+	-	+

+ : plus de 90% de réactions positives ; - moins de 10% de réactions positives ; v : plus de 10% et moins de 90% de réactions positives

Les lactocoques : taxonomie et caractéristiques générales

Ce sont des microorganismes mésophiles, à Gram positif, sans activité catalase, non mobiles et se présentant sous forme de coques disposés en paires ou en chainettes. Leur métabolisme est homofermentaire, de l'acide lactique (L+) étant produit par la voie des hexoses. Le genre *Lactococcus* comprend 6 espèces : *L. garviae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* et *L.lactis*, *L.chungangens* . Cette dernière espèce est divisée en trois sous-espèces : *L.lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* et *L. lactis* subsp. *hordniae*. Les lactocoques sont formés d'espèces dont les contenus en G+C varient de 34 % à 43%. Les caractéristiques générales distinctes des différentes espèces et sous-espèces sont détaillées dans le tableau 1.

Le génome complet de *L. lactis* subsp. *lactis* IL 1403 a été séquencé par Bolotin *et al.* (2002). L'information génétique de cette souche est stockée sur un chromosome circulaire de 2 365 589 paires de base (pb) codant pour 2 310 protéines. Les gènes codant pour ces protéines représentent 86% du génome.

De même, le génome complet de *L. lactis* subsp. *cremoris* MG1363 a été séquencé par Wegmann *et al.* (2007). Ce génome de 2 529 478 pb contient 81 pseudogènes et code pour 2 436 protéines.

Le lait est un habitat privilégié des lactocoques (Dellaglio *et al.*, 1994 ; Corroler *et al.*, 1999). Les lactocoques se retrouvent fréquemment dans les laits crus à des niveaux pouvant varier de 10 à 10 000 ufc.ml⁻¹, selon les études et les espèces laitières. Les niveaux sont supérieurs dans les laits de chèvre et de brebis, comparés au lait de vache (Desmasures *et al.*, 1997a ;1997b., Michel *et al.*, 2001 ; Tormo *et al.*, 2006 ; Casalta *et al.*, 2009 ; Mallet *et al.*, 2010). Il est toutefois difficile de comparer les niveaux des lactocoques mentionnés dans les études car les méthodes de dénombrement différent souvent. Parmi les lactocoques, *Lactococcus lactis* est l'espèce la plus étudiée et la plus fréquemment détectée dans les laits crus (Corroler *et al.*, 1998 ; Dalmaso *et al.*, 2008).

Les lactocoques transforment le lactose en acide lactique. Ceci permet l'acidification du lait et contribue à la formation du caillé. Ces bactéries possèdent par ailleurs des protéases. Selon Jeanson (2000), 2 types de protéases agissant sur les caséines (protéines impliquées dans la coagulation du lait) sont synthétisées :

- Type I : protéolyse de la caséine β ,
- Type II : protéolyse des caséines β , α 1 et κ .

Les lactocoques contribuent ainsi à la protéolyse primaire des fromages. Cette action est mineure, la protéolyse primaire étant principalement réalisée par les enzymes natives du lait ou celles de la présure (Grappin *et al.*, 1985). D'autre part, l'autolyse précoce des lactocoques permet la libération d'autres enzymes intracellulaires telles que des protéinases, des peptidases, des lipases ou des estérases. Ces mécanismes d'autolyse dépendent des souches de lactocoques. De nombreuses études ont montré l'impact considérable de ces enzymes sur le développement de la texture et de l'arôme des fromages pendant l'affinage (Carunchia Whetsine *et al.*, 2006 ; Garde *et al.*, 2006 ; Gutierrez-Mendez *et al.*, 2007).

L. lactis subsp. *lactis*, subsp. *cremoris* et biovar. *diacetylactis*, sont les trois bactéries les plus fréquemment citées pour leurs rôles majeurs différents, respectivement pour l'aptitude acidifiante (Casalta *et al.*, 1995, Lafarge *et al.*, 2004) et pour leur implication dans la formation du goût et de l'arôme pour les 2 dernières (Corroler *et al.*, 1999).

Les entérocoques : taxonomie et caractéristiques générales

Ce sont des coques Gram positif, sans activité catalase, non mobiles et présentant une grande diversité phénotypique (Devriese *et al.*, 1993 ; Park *et al.*, 1999). Trente cinq espèces ont été proposées comme faisant partie du genre *Enterococcus*. La plupart des espèces d'entérocoques sont capables de se développer à pH 9,6 en présence de 6,5% de NaCl, de 40% de sels biliaires, et peuvent survivre 30 minutes à 60°C. Le genre est formé d'espèces dont les contenus en G+C sont voisins (37,5 à 44%). Par contre, si l'on se réfère aux taux d'hybridation ADN-ADN, elles apparaissent génétiquement différentes les unes des autres et éloignées des autres coques Gram positif, sans activité catalase et anaérobies facultatifs.

Les entérocoques sont présents dans les laits et dans de nombreux fromages traditionnels du bassin méditerranéen (Cogan *et al.*, 1997). Ce sont des hôtes normaux des intestins des animaux à sang chaud, mais également des plantes et des insectes (Deibel, 1964 ; Dellaglio *et al.*, 1994). Dans le système digestif de l'homme et d'autres monogastriques, ils exercent une activité probiotique. Certaines souches peuvent cependant présenter des facteurs de virulence leur conférant un pouvoir pathogène (Dellaglio *et al.*, 1994). *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et dans une moindre mesure *Enterococcus durans* sont les espèces les plus fréquemment rencontrées dans les laits et les fromages (Gelsomino *et al.*, 2001 ; Jurkovic *et al.*, 2006 a et b ; Ogier et Serror, 2008).

Tableau 2 : Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces d'entérocoques (Dellaglio *et al.*, 1994)

Espèces	Croissance dans/à :				Résistance à 60°C /30min	Gaz à partir du glucose	Isomère de l'acide lactique	Production de :		
	Nacl 6.5%	10°C	45°C	50°C				Arginine dihydrolase	α galactosidas	β galactosidas
<i>Ec.durans</i>	+	+	+	-	+	-	L(+)	+	-	v
<i>Ec.faecalis</i>	+	+	+	v	+	-	L(+)			
<i>Ec.faecium</i>	+	+		+	+	-	L(+)	+	-	+

+ : plus de 90% de réactions positives ; - moins de 10% de réactions positives ; v : plus de 10% et moins de 90% de réactions positives

Tableau 3 : Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de leuconostocs (Dellaglio *et al.*, 1994)

Espèces	Croissance dans/à :						Gaz à partir du glucose	Isomère de l'acide lactique	Production de dextrane	Hydrolyse	
	Nacl 3%	Nacl 6,5%	15°C	30°C	37°C	45°C				Arginine	Esculine
<i>Ln.lactis</i>	±	-	-		+	-	+	D(-)	-	-	-
<i>Ln. mesenteroides ssp.cremoris</i>	-	-	+	+	-		+	D(-)	-	-	-
<i>Ln. mesenteroides. ssp.dextranicum</i>	±	-	+		+		+	D(-)	+	-	±
<i>Ln. mesenteroides. ssp.mesenteroides</i>	+	±	+		±	-	+	D(-)	+	-	±
<i>Ln.paramesenteroides</i>	±	±		+	±		+	D(-)	-	-	±

+ : plus de 90% de réactions positives ; - moins de 10% de réactions positives ; ± : réactions positives faibles ou tardives.

Dans les fromages, les niveaux peuvent s'élever jusqu'à 10^6 ufc.g⁻¹ dans le caillé et jusqu'à 10^7 ufc.g⁻¹ dans les fromages affinés (Macedo *et al.*, 1995 ; Bouton *et al.*, 1998 ; Centeno *et al.*, 1999). Ces niveaux élevés peuvent s'expliquer par la capacité des entérocoques à se développer en milieu acide et à des taux de sels élevés. Les entérocoques joueraient un rôle dans le développement des caractéristiques sensorielles des fromages (Neviani *et al.*, 1982.). Certaines souches sont d'ailleurs utilisées comme levains lactiques (Giraffa, 2003).

Le statut des entérocoques est, cependant, controversé. Ils sont plutôt considérés comme des microflore d'intérêt technologique dans les pays d'Europe du Sud. A l'inverse, les études menées en Europe du Nord portent essentiellement sur les aspects négatifs (pathogène opportuniste, résistance aux antibiotiques). L'expression des facteurs de virulence varie selon les niches écologiques. Ces facteurs s'expriment particulièrement pour les populations à risque (patients immunodéprimés, personnes âgées). Si aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'ingestion d'aliments contenant des entérocoques et l'infection, il semblerait que les entérocoques contenus dans les fromages puissent présenter des résistances à des antibiotiques utilisés dans le traitement des infections à entérocoques comme la gentamycine et la vancomycine (Ogier et Serror, 2008). Les efforts doivent donc porter sur la réduction du risque d'apparition de cette résistance en réduisant notamment l'utilisation d'antibiotiques en élevage.

Les Leuconostocs : taxonomie et caractéristiques générales

Les *Leuconostocs* sont des coques à Gram positif, mésophiles hétérofermentaires, aérobies anaérobies facultatifs. Les principaux produits de leur métabolisme des hexoses sont le D-lactate, l'acétate ou l'éthanol, le CO₂. A partir du citrate du lait, du diacétyle et de l'acétoïne sont formés (Devoyod et Poullain, 1988). Les caractéristiques phénotypiques de ces bactéries sont reportées dans le tableau 3. Leur contenu G+C est de l'ordre de 37% à 45%. Ces quinze dernières années, des changements taxonomiques ont été réalisés et de nouvelles espèces ont été décrites, ainsi que trois nouveaux genres : *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella* (Collins *et al.*, 1993 ; Dicks *et al.*, 1995). Le genre *Leuconostoc* comprend 12 espèces microbiennes : *L.mesenteroides* (avec trois sous-espèces, *mesenteroides*, *dextranicum* et *cremoris*), *L.citreum*, *L.carnosum*, *L.fallax*, *L.ficulneum*, *L.gasicomitatum*, *L.gelidum*, *L.inhae*, *L.kimchii*, *L.lactis* et *L.pseudomesenteroides*,

L.palmae, *L.holzapfelii* (<http://www.bacterio.cict.fr/1/Leuconostoc.html>, consulté le 10 juillet 2010).

Le génome complet de *L. citreum* KM20 a été séquencé par Kim et Adachi . (2007). L'information génétique de cette souche est stockée sur un chromosome circulaire de 1 796 284 paires de base (pb) et 4 plasmides. Le génome complet contient des gènes codant pour 1820 protéines.

Ces bactéries sont présentes dans de nombreux habitats naturels. Elles représentent notamment la microflore lactique dominante des végétaux frais. Les *Leuconostocs* sont fréquemment impliqués dans la fabrication d'aliments composés de végétaux fermentés ; l'espèce *Leuconostoc mesenteroides* étant majoritaire en début de fermentation avant que des bactéries plus acidifiantes dominant par la suite (Dellaglio *et al.*, 1994).

Les *Leuconostocs* sont fréquemment retrouvés dans le lait, les levains, les laits fermentés et les fromages à des niveaux atteignant 10^8 - 10^9 ufc.g⁻¹ de fromage en Crottin de Chavignol par exemple (Devoyod et Poullain, 1988). Les niveaux détectés dans les laits sont très variables : de moins de 100 ufc.ml⁻¹ jusqu'à plus de 10^3 ufc.ml⁻¹ (Casalta., 2003 ; Laithier *et al.*, 2004b).

Le rôle des *Leuconostocs* dans la formation de l'arôme et la texture des fromages est important (Hemme et Foucaud-Scheunmann, 2004). Les souches de *L. mesenteroides* et *L.lactis* métabolisent le citrate et produisent des composés aromatiques qui contribuent à la flaveur des fromages comme le diacétyle et l'acétoïne (Vedamuthu, 1994). Ainsi, certaines de ces souches sont introduites dans des levains lactiques en association avec des lactocoques car leur capacité acidifiante est limitée.

Cependant, les *Leuconostocs* peuvent également être à l'origine de trous précoces dans le caillé (Devoyod et Poulain, 1988), en raison de leur activité hétérofermentaire et gazogène. Bien qu'ils soient considérés comme non pathogènes pour l'homme et l'animal, des souches appartenant aux espèces *L. citreum* et *L. pseudomesenteroides* ont été isolées de prélèvements cliniques (Dellaglio *et al.*, 1994). Certaines espèces peuvent produire des amines biogènes qui peuvent provoquer des intoxications alimentaires, comme cela a été rapporté dans les vins (Moreno - Arribas *et al.*, 2003). Par contre, aucune étude, à notre connaissance, n'a identifié d'amines biogènes produites par les *Leuconostocs* dans les fromages (Gonzalez de Llano *et al.*, 1998 ; Bover-Cid and Holzapfel, 1999).

Tableau 4 : Principales caractéristiques physiologiques et biochimiques de quelques espèces de lactobacilles (Dellaglio *et al.*, 1994)

Espèces	Croissance à :		Température optimale de croissance	Température maximale de croissance	Isomère de l'acide lactique	Production de :	
	15°C	45°C				LDH allostérique	Arginine dihydrolase
<i>Lb.casei</i> (II)	+	v	30 à 37°C	<45°C	L(+)	+	-
<i>Lb.helveticus</i> (I)	-	+			DL	-	-
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> (II)	+	v			L(+)		-
<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>tolerans</i> (II)	+	-		<40°C	L(+)		-
<i>Lb.plantarum</i> (II)	+	-	30 à 37°C	<45°C	DL	-	-
<i>Lb.rhamnosus</i> (II)	+	+			L(+)		-

+ : plus de 90% de réactions positives ; - moins de 10% de réactions positives ; v : plus de 10% et moins de 90% de réactions positives

Les lactobacilles : taxonomie et caractéristiques générales

Le genre *Lactobacillus* est très hétérogène (le G+C varie de 33 % à 55%). Il contient 140 espèces et 27 sous-espèces, mais sa classification évolue régulièrement. Les lactobacilles sont des bacilles Gram positif, non mobiles, non sporulants, se développant dans des conditions microaérophiles à strictement anaérobies. Bien que certains travaux aient révélé la présence d'une catalase chez certaines souches de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Rochat *et al.*, 2006), les lactobacilles ne présentent généralement pas d'activité catalase .

Les lactobacilles se répartissent en trois groupes selon leur profil fermentaire, d'après la classification de Kandler et Weiss (1986) :

Les lactobacilles du groupe I (LBI) sont des bactéries homofermentaires strictes, ne fermentant que des hexoses. Les espèces de ce groupe fréquemment rencontrées dans les produits laitiers sont : *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus* et *L. helveticus* . Dans ce groupe, les écarts de contenu G+C sont élevés (33 à 53%).

Les lactobacilles du groupe II (LBII), lactobacilles hétérofermentaires facultatifs sont des bactéries qui fermentent les hexoses et produisent presque exclusivement de l'acide lactique. Ils peuvent également fermenter les pentoses après induction d'une phosphocétolase et produire de l'acide lactique et de l'acide acétique. Ce groupe rassemble entre autres *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* et *L. paracasei*. Les contenus en G+C sont compris entre 35 et 47% .

Les lactobacilles du groupe III (LBIII) sont hétérofermentaires stricts. L'utilisation des sucres suit la voie des pentoses phosphate et conduit à la formation de lactate, d'acétate ou d'éthanol et de CO₂. Les contenus en G+C sont très variables : de 33% à 53%.

Le tableau 4 reprend les principaux caractères phénotypiques propres aux lactobacilles.

Les séquences complètes du génome ont été établies pour 6 souches de *Lactobacillus* appartenant aux espèces *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. johnsonii*, *L. sakei*, *L. salivarius* et *L. plantarum*. Ce séquençage clarifiera probablement la classification de ce groupe (Dellaglio *et al.*, 2004).

Les lactobacilles sont les bactéries lactiques les plus ubiquitaires (Desmazeaud, 1992). Ils sont capables de coloniser des habitats très variés, pourvu que ces derniers répondent à leurs exigences de croissance, plus importantes que celles des lactocoques. Ainsi, les éléments indispensables à leur croissance sont certains acides aminés, des macroéléments (magnésium et potassium), ainsi que certains micro-éléments comme la niacine et le

panthothénate de calcium (Jeanson, 2000). Si l'on retrouve les lactobacilles dans le lait, l'habitat de la majorité des lactobacilles (en particulier ceux du groupe I) est le tractus digestif et les organes génitaux des animaux (Bernardeau *et al.*, 2008). Les lactobacilles du groupe II se retrouvent préférentiellement sur les végétaux (Dellaglio *et al.*, 1994). Certains d'entre eux constituent la flore majoritaire des ensilages (*L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paracasei*). Les niveaux de lactobacilles retrouvés dans les laits crus sont assez faibles pour les laits de vache et de chèvre. Ils se situent entre 10 et 100 ufc.ml⁻¹ (Desmasures *et al.*, 1997 ; Michel *et al.*, 2001 ; Tormo *et al.*, 2006 ; Malet *et al.*, 2010). Par contre, les niveaux sont plus élevés dans le lait de brebis, entre 1000 et 10 000 ufc.ml⁻¹, selon Casalta *et al.* (2009). Notons toutefois que pour la majorité des études citées, ce sont plutôt les lactobacilles du groupe II qui sont dénombrés.

Dans la majorité des cas, les lactobacilles du groupe II font partie de la microflore adventice désignée sous le terme de NSLAB (Non Starter Lactic Acid Bacteria). Apportés par le lait cru, ils peuvent s'implanter et se développer dans les fromages avec une forte capacité invasive. Dans le Comté, Bouton *et al.* (2002) ont montré que *L. delbrueckii* subsp. *lactis* originaire du lait cru se maintenait dans les fromages, alors que *L. helveticus*, utilisé comme levain, avait disparu en quatre semaines. Dans le Cheddar, les espèces de lactobacilles les plus fréquemment identifiées sont *L. plantarum*, *L. casei* et *L. brevis*. Les lactobacilles sont importants pour la flaveur des fromages (Kanawja *et al.*, 1996 ; Beresford *et al.*, 2001 ; Wouters *et al.*, 2002 ; Kieronczyk *et al.*, 2003). De façon plus générale, bien que la diversité des espèces dépende du type de fromage, les lactobacilles mésophiles les plus fréquemment rencontrés sont *L. casei*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* et *L. curvatus* (Beresford *et al.*, 2001).

Les lactobacilles du groupe I, notamment *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* et *L. helveticus*, entrent dans la composition de levains pour la fabrication de fromages de type pâtes pressées cuites. *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* ou *L. curvatus* peuvent également être utilisés comme compléments de ferments (Bernardeau *et al.*, 2008).

Les lactobacilles sont de bons producteurs d'acide lactique et parfois de substances antibactériennes. Ils contribuent grandement à l'équilibre des microflores. En effet, ils ont un rôle inhibiteur vis-à-vis du développement de microorganismes pathogènes (Klaenhammer, 1993 ; Batdorj *et al.*, 2007).

Certains lactobacilles du groupe III peuvent être à l'origine d'altérations, telles que le gonflement des fromages dû à la production de gaz, *L. bifermans* étant parfois mis en cause. D'autres défauts peuvent être attribués à la présence de *Lactobacillus*. La racémisation du L-lactate en D-lactate par certains lactobacilles peut entraîner l'apparition de cristaux blancs de lactate de calcium amers. L'apparition d'éraillures, voire de laminures peut également être liée à la production de gaz par les lactobacilles hétérofermentaires (groupes II et III).

D'autres lactobacilles sont considérés comme des pathogènes opportunistes (*L. catenaformis*, *L. crispatus*, *L. gasseri*) notamment impliqués dans les infections urinaires (Dellaglio *et al.*, 1994), alors qu'ils sont des commensaux reconnus au niveau vaginal par exemple. *L. buchneri* a été incriminé dans des intoxications alimentaires, du fait de la production, dans des fromages, d'histamine pouvant être hautement allergène chez certains individus, (Dellaglio *et al.*, 1994).

2.2.2. Les microflores d'affinage ou microflores de surface

Les principaux microorganismes jouant un rôle connu dans l'affinage sont les bactéries lactiques (déjà décrites), les bactéries propioniques, les levures, les moisissures, les staphylocoques et les bactéries corynéformes aérobies.

Les bactéries propioniques ne seront pas étudiées dans ce chapitre. En effet, ces bactéries sont impliquées dans la formation de l'arôme et des trous des fromages à pâtes pressées cuites, mais nous nous intéressons dans cette étude, uniquement aux microorganismes des fromages à pâtes molles de type lactique, principaux produits en lait de chèvre.

Parmi les bactéries dominantes à la surface des fromages, on retrouve les bactéries à Gram positif, majoritairement, les groupes des staphylocoques et des corynébactéries. Leur importance relative dépend du type de fromages. Les microflores de surface ont deux fonctions principales dans l'affinage :

- elles produisent des enzymes. Les lipases et les protéinases hydrolysent les matières grasses et les protéines. Les peptidases hydrolysent les petits peptides et les acides aminés,
- elles désacidifient la surface des fromages. Ce sont principalement les levures et les moisissures qui ont cette fonction. En oxydant le lactate, du CO₂ est émis, celui-ci contribue à l'augmentation du pH qui passe de 4,8 à 5,8, voir plus.

La taxonomie de ces groupes (en particulier les bactéries corynéformes) a été clarifiée par le développement des techniques de biologie moléculaire qui remettent en question les anciennes classifications basées uniquement sur des critères morphologiques et biochimiques. Sur le plan phylogénétique, ces bactéries diffèrent. Les bactéries corynéformes sont reliées à la branche des Actinobacteria (teneur en G+C supérieure à 50%), alors que les staphylocoques appartiennent à la branche des firmicutes (% G+C compris entre 30 et 39%). Les staphylocoques et les bactéries corynéformes possèdent en commun certains caractères physiologiques qui expliquent leur aptitude à s'implanter à la surface des fromages : elles sont mésophiles, halotolérantes et acido-sensibles, ne pouvant se développer que dans une zone de pH proche de la neutralité (6 à 8,5).

Les corynébactéries

Le groupe des bactéries corynéformes contient des genres bactériens hétérogènes. Les bactéries considérées ici (hors propionibactéries) sont des bacilles, majoritairement aérobies, Gram positif, pléomorphes, non sporulés. Pour les microbiologistes alimentaires, ces bactéries sont de formes irrégulières (bacilles ou coccobacilles) et sont isolées à la surface des fromages à croûte lavée. Elles sont souvent psychrotrophes et ne peuvent pas croître à 37°C. Le détail de la classification est mentionné dans le tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Classification hiérarchique des familles et genres bactériens décrits comme étant des bactéries corynéformes des fromages (Bockelmann et Hoppe-Seyler, 2001)

Classe	Sous -ordre	Famille	Genres principaux
<i>Actinobactéries</i>	<i>Micrococccinae</i>	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter, Micrococcus, Kocuria, Renibacterium</i>
		<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>
		<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium/Aureobacterium, Clavibacter, Curtobacterium, Agrococcus, Leucobacter, Mycetocola</i>
		<i>Dermabacteriaceae</i>	<i>Brachybacterium, Dermabacter</i>
	<i>Corynebacterinae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium, Turicella</i>
		<i>Nocardiaceae</i>	<i>Rhodococcus, Nocardia</i>

Tableau 6 : Habitats des bactéries corynéformes majoritairement isolées des laits et des fromages

Genres	Habitats	Genres et espèces isolées du lait et des fromages
<i>Arthrobacter</i>	Bactéries saprophytes très répandues dans le sol et l'environnement (Yi <i>et al.</i> , 2000 ; Loveland et Curtze., 1999 ; Paris and Blondeau, 1999)	<i>Arthrobacter sp.</i> isolé du Lait de chèvre (Callon <i>et al.</i> , 2007) et du Lait de vache (Verdier-Metz <i>et al.</i> , 2009). et fréquemment retrouvé dans les fromages (Valdès-Stauber <i>et al.</i> , 1997 ; Brennan <i>et al.</i> , 2002)
<i>Brevibacterium</i>	Lieux à haute concentration en sels tels que produits laitiers, eau de mer, poissons marins (Collins, 1981) Isolées de prélèvements cutanés	<i>Brevibacterium linens</i> isolé du Lait de vache (Verdier-Metz, 2009). et dans les fromages (Valdès-Stauber <i>et al.</i> , 1997 ; Bockelman <i>et al.</i> , 1997).
<i>Corynebacterium</i>	Sol, produits laitiers, mer, plantes et leurs déchets, isolées fréquemment chez l'homme, les animaux et leurs déchets (Irlinger, 2000)	<i>Corynebacterium variabile</i> isolé du lait de chèvre (Callon <i>et al.</i> , 2007) <i>Corynebacterium casei</i> isolé du lait de vache (Verdier-Metz <i>et al.</i> , 2009) Genre isolé fréquemment des fromages (Bockelman <i>et al.</i> , 1997 ; Valdès-Stauber <i>et al.</i> , 1997 ; Brennan <i>et al.</i> , 2002)
<i>Microbacterium/ Aureobacterium</i>	Eaux usées, produits laitiers, sol, végétaux et insectes (Irlinger, 2000)	<i>M.lactium</i> et <i>A.liquefaciens</i> ont été isolées du lait et des fromages (Jones et Collins, 1986)
<i>Micrococcus</i>	Environnement en général : sol, sable, plantes... Aliments, animaux, hommes, peau (Schleifer <i>et al.</i> , 1982 ; Kloos et Musselwhite, 1975)	<i>Kocuria sp.</i> a été isolée du lait de vache (Verdier-Metz <i>et al.</i> , 2009). Les micrococci représentent moins de 20% des coques Gram positifs isolés de la surface des fromages (Garcia <i>et al.</i> , 1988, Massa et Turtura, 1989). L'espèce la plus fréquemment rencontrée dans les fromages est <i>Kocuria varians</i>
<i>Brachybacterium</i>	Aliments, fromages et produits laitiers, animaux de la ferme	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> a été isolé du lait de chèvre (Callon <i>et al.</i> , 2007).
<i>Rhodococcus</i>	Fortement ubiquistes, abondantes dans le sol, l'eau, les déjections animales (Irlinger, 2000)	Isolé des fromages (Valdès-Stauber <i>et al.</i> , 1997).

A notre connaissance, aucune espèce de bactéries corynéformes isolées du lait et des produits laitiers n'est à l'origine de problèmes sanitaires dans nos pays industrialisés. D'autre part, la plupart des espèces isolées dans ces mêmes milieux ne présentent pas de mécanismes particuliers de résistance acquise aux antibiotiques (Denis et Irlinger., 2008). Ces bactéries dont les habitats diffèrent selon les espèces se retrouvent fréquemment dans le lait (tableau 6).

Les staphylocoques

Ce sont des coques Gram positif, caractérisés par une activité catalase, anaérobies facultatifs (meilleure croissance en aérobiose), non mobiles, souvent regroupés en amas ou en grappe, parfois en paires ou en tétrades. La plupart des souches peuvent se développer en présence de 10% de NaCl et à des températures comprises entre 10 et 40°C. Ils peuvent produire des acides à partir de différents sucres comme le glucose et le lactose. Les études d'hybridation ADN-ADN ont permis de classer les espèces en différents groupes phylogénétiques (Kloos et Wolfshohl, 1991 ; Takahashi *et al.*, 1999) :

Le groupe *S. epidermidis* comprenant les espèces *S. pasteurii*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. caprae*, *S. saccharolyticus*, *S. aureus* et *S. auricularis*.

Le groupe *S. saprophyticus* composé de *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus*, *S. arlettae*.

Le groupe *S. simulans* constitué de *S. simulans*, *S. carnosus*, *S. piscifermentans* et *S. felis*.

Le groupe *S. hyicus* comprenant *S. hyicus* et *S. chromogenes*.

Le groupe *S. sciuri* constitué de *S. sciuri*, *S. vitulinus* et *S. lentus*.

Le dernier groupe comprend *S. intermedius* et *S. delphini*.

L'espèce *S. lugdunensis* n'appartient à aucun des groupes précédents. La place des nouvelles espèces, *S. muscuae*, *S. lutrae*, *S. succinus* et *S. condimenti*, n'a pas encore été établie.

Actuellement, 42 espèces sont répertoriées comme appartenant au genre des staphylocoques. Certaines d'entre elles, productrices de coagulase et/ou d'entérotoxines sont potentiellement pathogènes, expliquant une classification dans le groupe 2 (OMS). On distingue 6 espèces à activité coagulase : *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. delphini* et *S. lutrae*, et certaines souches de *S. hyicus*. Les espèces restantes n'ont pas d'activité coagulase et celles qui sont résistantes à la novobiocine sont considérées comme des espèces d'origine animale (animaux de ferme), plutôt que des espèces d'origine humaine (Devriese *et al.*, 1985).

Tableau 7 : Habitats des espèces de *Staphylococcus*

Espèces les plus fréquentes	Habitat
<i>S. epidermidis</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. capitis</i> et <i>S. aureus</i>	L'homme (Kloos et Musselwhite, 1975) Niches préférentielles de différentes espèces aux différentes régions de la peau Taux de portage nasal de <i>S.aureus</i> de 30 à 50% chez les porteurs sains et de 60% chez les personnes hospitalisées.
<i>S. lentus</i> , <i>S. arlettae</i> , <i>S .capitis</i> , <i>S. pasteurii</i> et <i>S. simulans</i> (Irlinger, 2000)	Chèvre
<i>S. kloosii</i> , <i>S .lentus</i> et <i>S. aureus</i> (Irlinger, 2000)	Brebis
<i>S. hyicus</i> , <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> , <i>S .vitulinis</i>	Vache
La plupart des staphylocoques ont été isolés sporadiquement de sources très variées : terre, sable, eau, aliments, surfaces de travail, vêtement, air, poussière (Irlinger, 2008)	Environnement
<i>S .carnosus</i> (produits carnés, Schleifer et Fischer, 1982) <i>S. caseolyticus</i> (lait, viandes, Scheilfer <i>et al.</i> , 1982)	Aliments
<i>S. aureus</i> , <i>S .epidermidis</i> , <i>S. fleuretti</i> (Verdier-Metz, 2009) <i>S. pasteurii</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. epidermidis</i> (Ercolini <i>et al.</i> , 2009) <i>S. aureus</i> (Giannino <i>et al.</i> , 2009a,b)	Lait de vache
<i>S. epidermidis</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. equorum</i> (Callon <i>et al.</i> , 2007)	Laits de chèvre
<i>S. caprae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S .xylosus</i> , <i>S. chromogenes</i> et <i>S. simulans</i> (Bergonnier <i>et al.</i> , 2003)	Laits de chèvre (chèvre avec mammites subcliniques)
<i>S. equorum</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. vitulinus</i> , <i>S. xylosus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i> (Irlinger <i>et al.</i> , 1997 ; Bockelmann <i>et al.</i> , 1997 ; Hoppe-Seyler <i>et al.</i> , 2000 ; Bockelmann, 2002) <i>S. equorum</i> (Bockelmann, 2002), <i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i> (Place <i>et al.</i> , 2003)	Fromages
<i>S. fleuretti</i> (Vernozy-Rozand <i>et al.</i> , 2000)	Fromages de chèvre

Les espèces sans activité coagulase sont considérées comme non pathogènes ou uniquement de façon opportuniste. Parmi ces espèces, on trouve majoritairement *S. epidermidis* (responsable d'endocardites, d'ostéomyélites), *S. saprophyticus*, agent d'infections urinaires (Kloos et Bannerman, 1994) ou *S. caprae*, responsable d'infections de la mamelle de petits ruminants (Bedidi-Madani *et al.*, 1998), mais également de pathologies humaines de type endocardites ou cystites (Vandenesh *et al.*, 1995).

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires. Ils font partie notamment de la flore cutanéomuqueuse de l'homme et de l'animal et peuvent subsister dans l'environnement de leurs hôtes (tableau 7). Il est fort probable que les staphylocoques ont été initialement disséminés dans l'environnement par des hommes ou des animaux (libération de squames chargés de bactéries). Les staphylocoques à coagulase négative sont fréquemment impliqués dans les mammites subcliniques des petits ruminants. Ces bactéries sont impliquées dans les $\frac{3}{4}$ des infections subcliniques intramammaires (Bergonnier *et al.*, 2003). Pour les chèvres, *S. caprae* est l'espèce la plus fréquemment rencontrée, suivie de *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. chromogenes* et *S. simulans* (Bergonnier *et al.*, 2003 ; El Baradei *et al.*, 2007). Sporadiquement, les mammites cliniques chez la chèvre et la brebis peuvent être dues à *S. aureus*, puis à des staphylocoques à coagulase négative.

Certaines espèces sont isolées chez des hôtes variés, hommes, animaux, mais d'autres semblent adaptées à une espèce-hôte particulière, comme c'est le cas pour *S. lentus* qui n'a été isolé qu'à partir des laits de chèvre (Kloos, 1980 ; Devriese *et al.*, 1985).

Même si des espèces sont souvent impliquées dans les mammites cliniques ou subcliniques, plusieurs études ont mis en relief le rôle positif de certains staphylocoques coagulase négative (SCN) dans la production d'arômes des fromages. *Staphylococcus equorum* est fréquemment impliqué dans l'affinage des fromages, mais d'autres espèces comme *S. caprae*, *S. vitulinus*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. lentus*, *S. sciuri* et *S. succinus* subsp. *casei* peuvent être également impliquées (Irlinger *et al.*, 1997 ; Bockelmann *et al.*, 1997 ; Hoppe-seyler *et al.*, 2000 ; Bockelmann et Hoppe-seyler, 2001 ; Bockelmann, 2002). Des études récentes ont même suggéré que les espèces *S. equorum* (Bockelmann, 2002) et *S. succinus* subsp. *casei* (Place *et al.*, 2003) pourraient être utilisées comme ferments d'affinage dans les fromages à pâtes pressées Suisse. Par ailleurs, Carnio *et al.*, (2000) ont montré le rôle protecteur de certaines souches de SCN produisant des antibiotiques, en faveur du développement des bactéries lactiques. De fait, la souche *S. equorum* WS 2733 produit une molécule à effet bactériostatique vis à vis des souches de

Listeria et de nombreuses bactéries Gram positif. De même, *S. simulans* présente des effets bactéricides anti-staphylocoques liés à la production de lysostaphine, une enzyme dégradant la paroi cellulaire de pratiquement toutes les espèces de staphylocoques connues. Il permet, ainsi, le contrôle des populations de staphylocoques, malgré son potentiel pathogène pour l'animal (Recsei *et al.*, 1987 ; Von Eiff *et al.*, 2003).

Les levures et les moisissures

Les levures constituent une classe d'eucaryotes unicellulaires. Elles appartiennent à l'embranchement des ascomycètes et des basidiomycètes. Les levures ascomycètes peuvent, sous certaines conditions, former des ascospores à l'intérieur de la cellule, alors que les levures basidiomycètes développent des spores externes. Les levures peuvent se diviser soit par bourgeonnement comme pour *Saccharomyces*, soit par division comme *Shizosaccharomyces* par exemple. Dans certaines conditions, des espèces peuvent pousser sous forme de filaments irréguliers (*Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica* ...). Nous ne traiterons ici que des levures hemiascomycètes qui sont regroupées dans l'embranchement des ascomycètes. En effet, ces levures sont particulièrement rencontrées et utilisées dans les industries alimentaires (agents de fermentation, mais aussi microflores d'altération).

La caractérisation des levures dans les laits a été réalisée plus particulièrement sur des laits de vache et de chèvre issus de régions d'Italie (Nord de l'Italie pour le lait de vache, Sardaigne pour le lait de chèvre). Une quinzaine d'espèces différentes ont été isolées. Les genres *Candida*, *Cryptococcus*, sont communs aux deux espèces laitières. Certaines espèces sont détectées dans les deux types de laits (*Candida parapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus curvatus*) mais avec des prévalences différentes selon les espèces laitières (Cocolin *et al.*, 2002 ; Fadda *et al.*, 2010). *C. zeylanoides* est l'espèce dominante en lait de chèvre (Fadda *et al.*, 2010), alors qu'en lait de vache, cette espèce est sous-dominante (Cocolin *et al.*, 2002). *Kluyveromyces marxianus* et *Kluyveromyces lactis* sont les espèces dominantes dans les laits de vache étudiés. Les niveaux de levures et moisissures rencontrés dans les laits sont faibles, bien souvent inférieurs à 100 ufc.ml⁻¹, mais avec une grande variabilité en fonction des élevages (Desmasures, 1997c ; Torkar et Vengust., 2008).

Les principales espèces rencontrées dans les fromages sont les suivantes : *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida zeylanoides*, *Candida catululata*, *Candida intermedia*,

Geotrichum candidum, *Torulaspota delbrueckii*, *Yarrowia lipolytica* (Frolich-Wyder, 2003).

Certaines espèces de levures comme *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces* spp., *Candida* spp., sont considérées comme des microflores d'intérêt technologique en transformation fromagère. *Geotrichum candidum* est largement employé comme levain d'affinage en particulier pour les fromages à pâte molle et à croûte fleurie (Pottier *et al.*, 2008).

Elles viennent désacidifier la surface des fromages, permettant le développement des bactéries d'affinage (corynébactéries et staphylocoques). Par leurs activités enzymatiques (protéases, lipases, peptidases), elles jouent un rôle non négligeable dans la texture des fromages et la production de nombreux composés aromatiques. Les niveaux de levures trouvés dans les fromages affinés peuvent atteindre 10^9 ufc.g⁻¹.

Cependant, le développement excessif de certaines levures peut engendrer des défauts dans les fromages. Citons par exemple le cas de *G. candidum*. Lorsque celui-ci se développe trop rapidement et/ou se retrouve à des niveaux élevés dans les fromages, il engendre un défaut communément appelé « peau de crapaud ».

Concernant les risques pour la santé humaine, les espèces de levures rencontrées dans les fromages peuvent être retrouvées en pathologie humaine en tant qu'opportunistes, mais cette origine de contamination n'a jamais été mise en cause (Pottier *et al.*, 2008).

Les moisissures se développent à la surface des fromages. Elles ont un impact sur les caractéristiques sensorielles des fromages. Les moisissures se retrouvent fréquemment dans les laits, mais leur niveau moyen ne dépasse pas 10 ufc.ml⁻¹ (Michel *et al.*, 2001 ; Torkar et Vengust, 2008). Peu d'études portent sur la diversité des espèces de moisissures contenues dans les laits, du fait notamment de la difficulté d'identification des différentes espèces. Une étude menée en 2004, dans 4 fromageries en Norvège, fait état d'une grande diversité de moisissures dans les laits, le matériel de fromagerie et la saumure (Kure *et al.*, 2004). De nombreuses espèces des genres *Penicillium* et *Mucor* y sont retrouvées, ainsi que *Fusarium* (Kure *et al.*, 2004, Torkar et Vengust, 2008). Les principales moisissures rencontrées dans les fromages sont des *Penicillium*. *P. camemberti* est à l'origine de la croûte blanchâtre des fromages à pâtes molles et à croûte fleurie. *P. roqueforti* est responsable des veines bleues dans les pâtes persillées. La présence de *Mucor* est souvent en liaison avec un défaut de l'aspect des fromages communément appelé l'accident du « poil de chat » (Beuvier et Feutry, 2005).

Les espèces rencontrées sont environnementales et peuvent être retrouvées dans l'air, expliquant la contamination secondaire, en cours de fabrication.

2.2. La microflore indésirable et potentiellement pathogène

Les micro-organismes responsables d'altérations sont issus du milieu et des conditions de production. Leur développement dans le lait peut être à l'origine de l'altération de la qualité du fromage du fait de la dégradation de certains éléments protéiques, lipidiques ou glucidiques (lactose), ou encore du fait de la production de substances indésirables telles les mycotoxines. Ces altérations se traduisent par des défauts de goût, d'odeur, d'aspect et de texture (Beuvier et Feutry, 2005), il s'agit alors d'une altération de la qualité marchande. D'autres altérations peuvent avoir un impact sur la santé humaine, il s'agit alors d'une altération de la qualité sur le plan sanitaire. Les microflore précitées, comme par exemple les entérocoques, les levures et moisissures, peuvent être à l'origine de défauts technologiques, selon les souches en présence et leurs niveaux dans les laits et les fromages. Nous n'aborderons dans ce chapitre que les groupes ou genres bactériens reconnus comme spécifiquement néfastes et ne faisant pas partie des flores décrites précédemment.

2.2.1. Les coliformes

Le terme de coliformes désigne traditionnellement un certain nombre d'espèces appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, capables de fermenter rapidement le lactose. Ces bactéries possèdent les caractères phénotypiques suivants : ce sont des bacilles Gram négatif, non sporulés, sans activité oxydase, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de se multiplier en présence de sels biliaires et de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures à une température de 35-37°C. Ce groupe comprend classiquement les huit espèces suivantes : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus*. Les apports de la taxonomie génétique et numérique ont modifié la classification des entérobactéries et augmenté considérablement le nombre d'espèces affiliées aux coliformes. Il s'agit de nouvelles espèces dans les genres *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* ou d'espèces anciennement décrites, comme *Yersinia enterocolitica*, non rattachées précédemment aux

Enterobacteriaceae, ou de nouveaux genres tels que *Buttiauxella*, *Cedecea*, *Leclercia*, *Rahnella*.

Parmi les coliformes, il faut distinguer les coliformes thermotolérants (croissance à 44°C) ou fécaux provenant de l'intestin de l'homme et des animaux, des autres coliformes dont les espèces sont considérées comme environnementales. Pour la majorité des espèces de coliformes, le réservoir est aqua-tellurique d'une part, animal et humain d'autre part. Plus de la moitié de ces espèces, isolées de terres vierges et d'eaux d'alimentation potables n'ont jamais été impliquées dans des processus pathologiques.

La microflore Gram négatif représente une part importante de la population microbienne des laits fortement contaminés (Richard, 1983). Cependant, les mesures d'hygiène croissante ces 20 dernières années aboutissent à des niveaux des microflores nettement plus bas, et en particulier pour les coliformes qui sont souvent des indicateurs d'hygiène (en particulier les coliformes thermotolérants). Actuellement, en France, il est courant d'avoir des niveaux de coliformes dans le lait inférieurs à 1000 ufc.ml⁻¹ (Desmaures *et al.*, 1997 ; Michel *et al.*, 2001 ; Tormo *et al.*, 2006). Les genres les plus fréquemment isolés dans les laits sont les suivants : *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Yersinia* (Saubusse *et al.*, 2007 ; Ercolini *et al.*, 2009 ; Giannino *et al.*, 2009b). Ces genres se retrouvent également dans les fromages (Coiffier, 1992).

Lorsque les coliformes sont à des niveaux élevés dans les laits ou encore dominants, ils sont responsables des gonflements précoces des fromages (Coiffier, 1992 ; Demarigny *et al.*, 1997), du fait de la production de gaz carbonique et d'hydrogène très peu soluble dans le lait. Ils peuvent conférer un aspect spongieux au fromage (Beuvier et Feutry, 2005). Cette production dépend des souches : seules en sont responsables celles qui synthétisent une hydrogènelyase. Etant donnés les niveaux importants atteints dans certains fromages à pâte molle (10⁶ à 10⁸ ufc.g⁻¹) et du fait de leur aptitude à dégrader des acides aminés, ils présentent un intérêt dans l'élaboration du goût, (Coiffier, 1992). Cependant, les coliformes thermotolérants sont considérés comme des indicateurs de contamination fécale, c'est-à-dire que leur présence souligne un risque potentiel de présence de pathogènes entériques comme les salmonelles. Par ailleurs, certains sont des opportunistes et peuvent induire des infections chez l'homme. Véhiculés dans le lait de façon accidentelle lors de la traite, leur ingestion peut être à l'origine d'intoxications alimentaires. Ainsi, certaines souches d'*Escherichia coli* produisent des toxines qui

provoquent des diarrhées. D'autres souches sont considérées comme hautement pathogènes (*E.coli* O 157 : H7) et peuvent provoquer des complications rénales et hémorragiques.

2.2.2. Les *Pseudomonas*

Ce sont généralement des bactéries psychrotrophes, capables de se développer à 7°C ou moins, indépendamment de leur optimum de croissance. En fait, la température minimum d'activité métabolique des psychrotrophes est proche de -10°C. Le genre *Pseudomonas* renferme des bacilles Gram négatif, droits ou légèrement incurvés, de 0,5 à 1,0 µm de diamètre sur 1,5 à 5,0 µm (ou plus) de longueur, non sporulés, très généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires, aérobies, à métabolisme strictement respiratoire, utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons (les nitrates sont parfois utilisés comme accepteur d'électrons ce qui permet une croissance en anaérobiose), chimio-organotrophes, présentant une activité catalase, et généralement une activité oxydase, non producteurs d'indol et d'acétoïne et ne se cultivant pas à un pH inférieur à 4,5.

Les analyses phylogénétiques, basées sur le séquençage des ARNr 16S, permettent de répartir les *Pseudomonas sensu stricto* en deux grands groupes : le "groupe de *Pseudomonas aeruginosa*" et le "groupe de *Pseudomonas pertucinogena*".

Le "groupe de *Pseudomonas aeruginosa*" est lui-même subdivisé en six sous groupes : "sous-groupe de *Pseudomonas syringae*", "sous-groupe de *Pseudomonas chlororaphis*", "sous-groupe de *Pseudomonas fluorescens*", "sous-groupe de *Pseudomonas putida*", "sous-groupe de *Pseudomonas stutzeri*" et "sous-groupe de *Pseudomonas aeruginosa*". (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/pp/pseudomonadales.html> consulté le 2 mai 2010).

Les *Pseudomonas* sont largement répandus dans le sol, l'eau et l'environnement. On les retrouve souvent sur la peau des mamelles de vache (Chatelin et Richard, 1981 ; Desmasures *et al.*, 1997b) et dans les installations de traite (Chatelin et Richard, 1981 ; Laithier *et al.*, 2004a). Ils sont retrouvés très fréquemment dans les laits crus réfrigérés (Desmasures, 1995 ; Leriche *et al.*, 2004 ; Giannino *et al.*, 2009b ; Ercolini *et al.*, 2009). L'espèce la plus répandue dans les laits est *P. fluorescens* (Richard, 1981). Les niveaux de *Pseudomonas* dans les laits de vache sont variables selon les études. D'après Michel *et al.* (2001), le niveau moyen est de 148 ufc.ml⁻¹ dans les laits prélevés dès la fin de la traite. Pour Desmasures *et al.* (1997), il peut s'élever à 1,8 10³ ufc.ml⁻¹ dans les laits réfrigérés. La production d'enzymes (protéases et lipases) thermostables peut être responsable de défauts de goût, notamment de l'amertume (Lemieux et Simard, 1991), ainsi que des

défauts de croûtage, ceci dans les technologies à pâte molle, croûtes lavées ou pâtes lactiques. Par ailleurs certaines espèces, notamment *Pseudomonas fluorescens* produisent des pigments qui sont à l'origine de défauts de coloration de la surface des fromages. Berdague *et al.* (1990) rapportent, cependant, un intérêt des *Pseudomonas* dans la production d'enzymes participant à l'affinage. Demarigny *et al.* (1997) a décrit, dans ce sens, l'action bénéfique de ces bactéries sur la présure, favorisant ainsi le métabolisme des bactéries lactiques.

2.2.3. Les staphylocoques à coagulase positive

Ils sont principalement représentés par *Staphylococcus aureus*, pathogène présent dans le lait cru. L'origine principale de cette contamination est l'excrétion de *S. aureus* par des animaux laitiers atteints de mammites (De Buyser et Lapeyre, 1994). Cette bactérie est responsable d'une proportion importante des mammites subcliniques et chroniques chez la vache laitière, comme chez les petits ruminants et d'environ un tiers des mammites cliniques. Ces infections de longue durée sont parmi les plus difficiles à guérir par l'antibiothérapie et sont donc fréquentes. D'autre part, la colonisation de la peau, des muqueuses (notion de porteurs sains) et l'infection des lésions superficielles des trayons par *S. aureus* constituent également des sources de contamination du lait dont l'importance est mal connue. L'homme ayant des plaies contaminées ou des abcès peut être également un vecteur, y compris en tant que porteur sain (portage nasal). Selon une étude menée par Lamprell (2003), le biotype A humain est détecté dans moins de 3% des échantillons de laits et de fromages analysés.

L'ingestion de toxine produite par *S.aureus* provoque des troubles gastro-intestinaux causant une déshydratation qui peut être grave chez des sujets à risques. En France, une étude menée en filière caprine portant sur environ 200 producteurs fait état de niveaux très variables de *S.aureus* dans les laits, selon les élevages et la saison. Les niveaux varient de 10 ufc.ml⁻¹ à 1000 ufc.ml⁻¹. Il est rarissime (<0,5%) que les résultats se maintiennent au-delà de 1000 ufc.ml⁻¹ (De Crémoux *et al.*, 2008). Dans cette même étude, la plupart des souches isolées des chèvres infectées possède le gène codant pour l'entérotoxine de type C. En dépit de la fréquence élevée des souches potentiellement entérotoxigènes, aucun des fromages analysés n'a révélé de présence d'entérotoxines. En ce qui concerne le typage des souches, les chèvres excrétrices constituent la source majeure de contamination des fromages. Néanmoins, d'autres sources de contamination existent (portage cutané des

mamelles, biofilms présents dans l'installation de traite et exceptionnellement le portage humain). De plus, cette étude a permis de mettre en évidence la présence de laits inhibiteurs des *S.aureus* (limitation de la croissance des *S.aureus* d'environ une à trois unités logarithmiques). L'étude des écosystèmes microbiens a permis de proposer l'hypothèse de l'intervention de certains lactocoques dans l'expression du potentiel inhibiteur des laits. La production de peroxyde d'hydrogène par certaines souches de lactocoques permettrait l'activation du système lactoperoxydase.

En lait de vache, les niveaux de *S.aureus* sont similaires à ceux des laits de chèvres. Ainsi, Michel *et al.* (2001) font état d'un niveau moyen de *S.aureus* de $112 \text{ ufc} \cdot \text{ml}^{-1}$, dans des laits de vache des élevages de Savoie.

La norme Européenne pour les fromages au lait cru impose de rechercher la toxine staphylococcique lorsque le niveau de *S.aureus* dépasse $10^5 \text{ ufc} \cdot \text{g}^{-1}$ de fromages (Règlement Européen 2073 / 2005).

2.2.4. Les autres bactéries pathogènes

Il existe d'autres bactéries pathogènes telles *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, et certaines souches d'*Escherichia coli* que l'on peut rencontrer de manière accidentelle dans le lait (Sanaa, 1993 ; Heuchel *et al.*, 2001 ; Raynaud et Heuchel, 2005). Ces deux dernières provoquent les mêmes symptômes que *Staphylococcus aureus*, alors que la première peut provoquer la listériose, à l'origine d'avortements et de troubles nerveux. Cette maladie touche également les nouveau-nés ainsi que les adultes immunodéprimés chez qui elle peut se manifester, à l'extrême, par des septicémies ou des méningites. Cependant, en production fermière de caillés lactiques, le risque de développement de *Listeria* et *Salmonella* est très faible dès lors que le pH du caillé est inférieur à 4,5.

Tableau 8 : Niveaux moyens de flores totales, de coliformes et de staphylocoques à coagulase positive dans les laits pour différents pays méditerranéens (Morgan *et al.*, 2003)

	Flore totale (ufc.ml ⁻¹)	Coliformes (ufc.ml ⁻¹)	Staphylocoques à Coagulase Positive (ufc.ml ⁻¹)
France	1,1.10 ⁵	1,4.10 ²	2,75.10 ²
Portugal	4,0.10 ⁷	2,5.10 ⁶	7,6.10 ⁴
Grèce	3,6.10 ⁷	1,8.10 ⁶	1,7.10 ⁵

Tableau 9 : Ordre de grandeur moyens (ufc.ml⁻¹) de quelques groupes microbiens couramment dénombrés dans les laits crus de vache, chèvre et brebis d'après Desmasures et Beuvier (2010)

Groupes microbiens dénombrés	Lait de vache (1)	Lait de chèvre (2)	Lait de brebis (3)
Staphylocoques et bactéries corynéformes aérobies	100-1000	1000	100-1000
Lactocoques	10-100	100-1000	10000
Lactobacilles	10-100	100	1000-10000
Leuconostocs	10-100	100-1000	10000-100000
Entérocoques	10-100	100-1000	10
Bactéries propioniques	10	-	-
Bactéries à Gram négatif -dont Entérobactéries -dont Pseudomonas sp	100-1000 10 100-1000	10-100	
Levures	10-100	10-100	
Moisissures	<10	<10	
Spores aérobies	<10		
Bactéries coliformes	<10	100	

(1) Desmasures *et al.*, 1997 ; Michel *et al.*, 2001 ; Mallet *et al.*, 2010

(2) Barral *et al.*, 2008 ; Casalta *et al.*, 2009 ; Tormo *et al.*, 2006 ; Larruhart, 2009

(3) Casalta *et al.*, 2009 ; Feutry *et al.*, 2010

3 - IMPORTANCE ET DIVERSITE DES MICROFLORES DES LAITS CRUS

3.1. La microflore totale

Les niveaux de microflores totales ou FMAR (Flore Mésophile Aérobie Revivifiable) apparaissent très variables selon les différentes études, issus de pays différents. Cette variabilité peut être attribuée en partie aux conditions de production et aux conditions climatiques qui diffèrent selon les régions. Si dans les années 1990, un lait était considéré en France comme ultra-propre en deçà de $5,0 \cdot 10^4$ ufc.ml⁻¹, une grande partie de ces laits 'pauci-microbiens' (très peu chargés et ultra-propres), présentent de nos jours des niveaux de flore totale inférieurs à $5 \cdot 10^3$ ufc.ml⁻¹ (Desmaures *et al.*, 1997 ; Michel *et al.*, 2001 ; Bouton *et al.*, 2005 ; Mallet *et al.*, 2010). En lait de vache, 49 espèces bactériennes environnementales ont été identifiées (Bouton *et al.*, 2007 ; Normand *et al.*, 2007). Morgan *et al.* (2003), dans une étude comparative des laits crus de chèvres récoltés en France, en Grèce et au Portugal, ont mis en évidence de grandes différences entre les niveaux de flores. Les laits des troupeaux français sont nettement moins chargés en flore totale, coliformes et staphylocoques à coagulase positive (tableau 8).

3.2. Les microflores d'intérêts technologiques et les microflores d'altération

La nature des microflores du lait est un élément déterminant de la richesse aromatique des fromages au lait cru (Bouton, 2005). Parmi les grands groupes microbiens dénombrés dans les laits crus, les staphylocoques et les bactéries corynéformes ainsi que les bactéries lactiques sont systématiquement mis en évidence (Casalta *et al.*, 2009 ; Desmaures *et al.*, 1997a ; Michel *et al.*, 2001 ; Ercolini *et al.*, 2009 ; Gianninio *et al.*, 2009 b ; Mallet *et al.*, 2010). Le niveau de lactocoques dans les laits est très variable selon les pays. Citons à titre d'exemple, l'étude menée par Alonso-Calleja *et al.* (2002) où les niveaux de lactocoques, très élevés, étaient similaires à la flore totale (de l'ordre de 10^7 ufc.ml⁻¹). L'ordre de grandeur moyen de quelques groupes microbiens couramment dénombrés dans les laits en France est reporté dans le tableau 9.

Tableau 10 : Inventaire de la diversité des genres de bactéries et levures dans des laits crus de vache et de chèvre

Groupes microbiens	Lait de vache ¹	Lait de chèvre ²
Bactéries lactiques	<i>Aerococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i>
Staphylocoques et bactéries corynéformes	<i>Arthrobacter</i> <i>Clavibacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Macroccus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Leucobacter</i> , <i>Leifsonia</i> , <i>Rothia</i> , <i>Renibacterium</i> , <i>Rodococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	<i>Arthrobacter</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Dietzia</i> , <i>Jeotgalicoccus</i> , <i>Kocuria</i> , <i>Macroccus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Microccus</i> , <i>Ornithinococcus</i> <i>Rothia</i> , <i>Salinicoccus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Levures	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Geotrichum</i> , <i>Issatchenkia</i> , <i>Kazachstania</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Pichia</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Trichosporon</i>	<i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Debaromyces</i> , <i>Kluyveromyces</i> , <i>Trichosporon</i>
Bactéries sporulantes (dont butyriques)	<i>Bacillus</i> <i>Brevibacillus</i> , <i>Clostridium</i>	<i>Bacillus</i> <i>Clostridium</i>
Entérobactéries (dont coliformes)	<i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Hafnia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Pantoea</i>	<i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Pantoea</i>
Autres bactéries à Gram négatif (dont psychrotrophes)	<i>Acinetobacter</i> , <i>Brevundimonas</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Moraxella</i> , <i>Comamonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Sphingobacterium</i> , <i>Stenotrophomonas</i> <i>Xanthomonas</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>Chryseobacterium</i> , <i>Delfia</i> , <i>Exigobacterium</i> , <i>Hahella</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Stenotrophomonas</i>

¹ : Ercolini et al., 2009 ; Giannino et al., 2009a,b ; Mallet et al., 2010 ; Saubusse et al., 2007

² : Callon et al., 2007 ; Cheriguene et al., 2007

Globalement, en France, les microflores d'intérêts technologiques sont à des niveaux plus élevés que les microflores d'altérations. Les coliformes peuvent ainsi être détectés à des niveaux (en moyenne) 10 fois plus faibles que ceux des microflores d'intérêts technologiques (Michel *et al.*, 2001 ; Tormo *et al.*, 2006). Cette tendance dépend cependant des élevages, et Michel *et al.* (2001) soulignent l'importance des pratiques de production du lait sur les niveaux des différentes microflores.

3.3. Diversité des microorganismes du lait

Il existe peu de travaux récents consacrés à un inventaire de la diversité microbienne des laits crus. Le peu de données publiées portent sur le lait de vache et secondairement celui de chèvre (tableaux 10 et 11). Une quarantaine de genres microbiens et près de 150 espèces différentes dans des laits prélevés dans douze exploitations bovines en Normandie ont été identifiés par Mallet *et al.* (2010). Callon *et al.* (2007) ont mis en évidence près de 40 espèces microbiennes dans des laits de chèvre prélevés dans une exploitation en Rhône Alpes. En Italie, une quinzaine d'espèces microbiennes ont été détectées dans des laits de vache (Ercolini *et al.*, 2009 ; Giannino *et al.*, 2009a, 2009b).

Au sein du groupe des bactéries lactiques, 23 espèces ont été détectées dans les laits (tableau 11). Dalmaso (2008) s'est intéressée à l'évolution des populations de bactéries lactiques (lactocoques, lactobacilles, *Leuconostocs* et entérocoques) dans du lait cru de vache d'une exploitation, prélevé pendant 12 jours successifs. L'étude de la diversité infra-spécifique de *Lactococcus lactis* a révélé 11 groupes de souches distincts, dont 2 représentés de façon permanente (Dalmaso *et al.*, 2008).

3.4. Effet de la saison sur les niveaux de microflores des laits

Les niveaux de flores présentent souvent de fortes variabilités au sein d'une exploitation, expliquées en partie par l'effet de la saison. Ce concept superpose l'effet du cycle temporel, avec des variations extrinsèques des températures et des durées du jour, ainsi que l'effet du stade de lactation. Cependant, les pratiques peuvent être différentes selon les saisons, rendant difficiles la distinction des impacts respectifs.

Tableau 11 : Biodiversité spécifique des bactéries lactiques dans des laits crus de vache, chèvre, brebis d'après (1) : Bouton *et al.*, 2006 ; Dalmasso *et al.*, 2008 ; Rasolofo *et al.*, 2010 (2) : Badis *et al.*, 2003 ; Callon *et al.*, 2007 (3) : Caridi *et al.*, 2003 ; Feutry *et al.*, 2010.

Espèces	Lait de vache (1)	Lait de chèvre (2)	Lait de Brebis (3)
<i>L.lactis</i> ssp <i>lactis</i> , <i>L.lactis</i> ssp <i>cremoris</i> <i>Lactococcus garviae</i>	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>E.durans</i> <i>E.faecium</i> <i>E.hirae</i> <i>E. saccharominimus</i>	+	+	+
<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paraplantarum</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>lactis</i> <i>Lb. delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb.casei</i> <i>Lb.paracasei</i> <i>ssp.paracasei</i> <i>Lb. animalis</i> <i>Lb. curvatus</i>	+	+	+
<i>Ln mesenteroides</i> <i>Ln pseudomesenteroides</i> <i>Ln lactis</i> <i>Ln citreum</i>	+	+	+

Ainsi, Kalogridou-Vassiliadou *et al.* (1991) ont observé des augmentations des niveaux de staphylocoques, microcoques et streptocoques dans des laits de chèvre durant les mois de mai, juin et juillet. De même, dans une étude portant sur le lait cru de brebis, Salmeron *et al.* (2002) ont montré l'existence de variations saisonnières dans dix groupes de microorganismes, avec des niveaux globalement plus élevés au printemps. Delgado-pertiñez *et al.* (2003) ont étudié les niveaux de flore totale de lait de chèvre sur une lactation. Les niveaux les plus élevés de flore totale ont été enregistrés durant les mois de janvier et avril, alors que les plus bas niveaux étaient enregistrés en juillet contrairement à la majorité des études menées en lait de vache. Cependant, Bouton *et al.* (2005), dans une étude sur les laits utilisés pour la fabrication du Comté, ont mis en évidence des variations saisonnières des niveaux de bactéries d'intérêt technologiques et de bactéries psychrotrophes. Ils apparaissent deux fois plus élevés en été qu'en hiver, hormis pour les microcoques (tableau 12 ci dessous).

Tableau 12 : Variations saisonnières de quelques groupes microbiens des laits de vache (Bouton *et al.*, 2005)

N=107 laits	Moyennes estivales (ufc.ml ⁻¹)	Moyennes hivernales (ufc.ml ⁻¹)
Bactéries psychrotrophes	1,17.10 ³	Environ 5,5.10 ²
Entérocoques	25	Environ 12
Bactéries propioniques	35	Environ 17
Lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (LbII)	55	Environ 27
Microcoques	Environ 7,0.10 ²	1,42.10 ³

Ces niveaux plus hauts de bactéries psychrotrophes ont également été retrouvés dans une étude portant sur l'analyse des laits issus de 1943 exploitations (Raynaud *et al.*, 2005). Dans cette même étude, les coliformes, considérés comme une flore d'altération, sont également plus élevés en été.

Vyletelya *et al.* (2000) ont également montré l'existence de variations saisonnières des niveaux de bactéries psychrotrophes et mésophiles présentes dans le lait réfrigéré. Les bactéries psychrotrophes ont les niveaux les plus élevés en fin d'été, début d'automne, alors que les niveaux les plus bas sont enregistrés entre l'hiver et le printemps (février, avril et juin). Les bactéries mésophiles atteignent des niveaux les plus hauts en mars, puis en milieu d'été (juillet et août), alors qu'elles présentent leurs plus faibles niveaux en juin,

puis en fin d'automne (tableau 13). Les variations existantes ont par ailleurs été corrélées à la zone de production.

Tableau 13 : Variations saisonnières des bactéries mésophiles et psychrotrophes des laits crus de vache (Vyletelya *et al.*, 2000)

	Bactéries mésophiles		Bactéries psychrotrophes		
	Mars	Juillet - Août	Juillet	Septembre - Octobre	
Niveaux plus élevés (ufc.ml ⁻¹)	41000	39000	6700	6200- 5700	
Niveaux plus faibles	Juin	Octobre-Novembre	Février	Avril	Juin
	26700	26200 - 23300	4600	2740	4500

4 - LES RESERVOIRS DE MICROFLORES DES LAITS CRUS

Le lait intra mammaire étant stérile, l'origine des flores des laits crus a longtemps été l'objet d'interrogations. Une réponse plausible étant l'enrichissement naturel en microorganismes entre la sortie de la mamelle et la réception du lait. Parallèlement, il existe d'autres réservoirs de bactéries : ce sont les litières, les fèces, les fourrages, le sol, l'eau, les matériaux de fabrication fromagère et les bâtiments. Michel *et al* (2005) ont expliqué que certains groupes microbiens du lait cru avait diverses origines, notamment les trayons des animaux, le matériel de traite et l'environnement.

4.1 Les trayons

Les données les plus nombreuses sur les microorganismes présents à la surface des trayons avant préparation concernent la vache laitière. La peau des trayons a d'abord été étudiée comme vecteur principal de contamination en microflore d'altération dans les années 80 (Chatelin et Richard, 1981 ; Piton et Richard, 1982). Le niveau de microflore des laits était nettement plus élevé qu'actuellement (niveaux moyens de l'ordre de 500 000 germes totaux.ml⁻¹) et il était nécessaire à l'époque de réduire la charge microbienne pour limiter les problèmes sanitaires et technologiques retrouvés dans les fromageries.

Ces quinze dernières années, les études menées plus particulièrement en France portent sur une plus grande connaissance de l'ensemble des microorganismes de la peau des trayons, microflore d'intérêt, d'altérations ou pathogènes. Les travaux de Bouton *et al.* (2005), de

Michel *et al.* (2001 ; 2005) réalisés sur des élevages bovins montrent qu'il existe une grande variété de groupes microbiens présents en surface des trayons (9 groupes microbiens détectés sur 11 recherchés d'après Michel *et al.*, 2005) et que les microflores d'intérêts fromagers sont largement dominantes. Leurs niveaux peuvent être 100 fois supérieurs aux microflores d'altération (Michel *et al.*, 2005). Dans cette même étude, les microflores acidifiantes mésophiles ainsi que les microflores de surface sont présentes sur tous les trayons à des niveaux de l'ordre de 10^6 à 10^7 ufc par unité de surface de trayon. Les microflores d'altération sont également présentes, mais à des niveaux moindres. Les *Pseudomonas* sont détectés dans 92% des échantillons à des niveaux moyens de l'ordre de 10^4 ufc par unité de surface de trayon. Les coliformes sont détectés dans 95% des échantillons à des niveaux compris entre 10^3 et 10^4 ufc par unité de surface de trayon. Les microorganismes potentiellement pathogènes que sont les staphylocoques à coagulase positive font partie des microflores minoritaires : leur présence n'est détectée que dans deux tiers des prélèvements et à des niveaux inférieurs à 10^4 ufc/surface de trayons. Ce faible niveau est à considérer cependant avec prudence, les trayons analysés étant tous sains et exempts de blessures ou de boutons.

Des travaux plus récents (Monsallier *et al.*, 2009) vont dans le même sens que ceux de Michel *et al.* (2005) dans la hiérarchisation des groupes de microflores (intérêts, altérations, pathogènes). Dans cette dernière étude, les microflores de surface et d'affinage sont à des niveaux proches de celui de la flore totale. Les microflores lactiques ne seraient que sous-dominantes et constituées principalement par les entérocoques. L'étude de Desmasures *et al.* (1997b) corrobore la sous-dominance des *Pseudomonas* et des microflores acidifiantes comme *Lactococcus lactis*.

Contrairement aux études antérieures, Gill *et al.* (2006) ont montré une grande diversité de microorganismes dans le canal du trayon des vaches laitières, 45 espèces ont été répertoriées. Parmi 80 clones, 20 appartiennent sont des staphylocoques, dont les staphylocoques à coagulase négative.

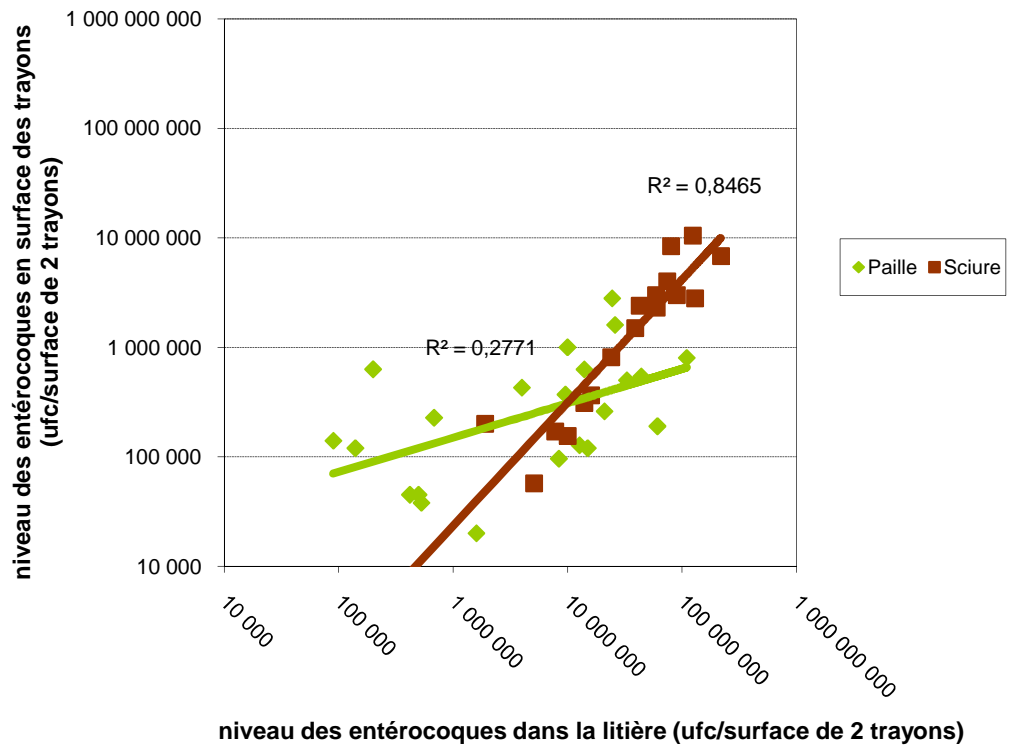


Figure 2 : Corrélation entre les niveaux d'entérocoques en surface des trayons et dans les litières (Joandel, 2007)

4.1.1. Facteurs de variabilité des microflores en surface des trayons

La nature de la litière

Le contact entre la litière et les trayons a, bien entendu, un impact sur la microflore présente à la surface des trayons (Rendos *et al.*, 1975 ; Zdanowicz *et al.*, 2004). Une étude menée par le GIS Alpes du Nord (2009) fait état de corrélations entre les niveaux de certains groupes microbiens présents dans les litières et leurs niveaux à la surface des trayons (flore mésophile aérobie revivifiable, flore acidifiante mésophile, entérocoques, levures). D'autre part, Bouton *et al.* (2007) ont isolé des espèces de lactobacilles communes aux trayons et à la paille utilisée comme litière ou comme aliment.

La nature de la litière peut influencer sur la nature et le niveau des microflores à la surface des trayons. Zdanowicz *et al.* (2004) ont montré l'existence d'une corrélation entre le niveau de coliformes sur les trayons et dans une litière constituée de sable ou de sciure. Les niveaux élevés de toutes les microflores dénombrées dans le cadre de cette étude (coliformes, streptocoques, *Klebsiella*) sur les trayons sont corrélés avec une litière faite de sciure. Ainsi, les niveaux de coliformes sur les trayons étaient dix fois supérieurs chez les vaches hébergées sur des litières constituées de sciure que sur des litières constituées de sable. Les litières à base de sciure semblent favoriser la contamination en microorganismes des surfaces des trayons par comparaison avec les litières à base de paille ou de copeaux. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus par Michel *et al.* (2005). Ainsi, le lien entre les niveaux d'entérocoques en surface des trayons et la nature des litières est beaucoup plus important avec des litières à base de sciure qu'avec des litières à base de paille (figure 2). Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que l'adhésion de la sciure à la surface des trayons est plus facile que pour la paille ou les copeaux.

Il n'existe pas, à notre connaissance, d'études publiées portant sur le degré de souillure des litières et les microflores de la surface des trayons.

Les pratiques autour de la traite

Dans l'espèce bovine, les facteurs influençant les microflores présentes à la surface des trayons sont essentiellement liés aux pratiques autour de la traite (Piton et Richard, 1982 ; Michel *et al.*, 2001 ; Bouton *et al.*, 2005 ; Michel *et al.*, 2005). Les études les plus anciennes portent sur la réduction de la quantité des microorganismes véhiculés par la peau des mamelles. Une hygiène soignée des mamelles (lavette propre additionnée de détergent,

rinçage à l'eau de javel et essuyage) permet de réduire de facteurs 100 à 1000 la microflore des trayons (Piton et Richard, 1982).

Plus récemment, les travaux menés par Michel *et al.* (2001 ; 2005) ont montré que la majorité des laits ayant des niveaux de microflore élevés et des niveaux de staphylocoques à coagulase positive faibles sont issus de laits provenant d'élevages où les pratiques d'hygiène des trayons sont allégées : pas de nettoyage des mamelles, ou nettoyage à sec, ou encore un nettoyage collectif. À l'inverse, l'emploi de produits désinfectants dans la préparation des trayons réduit d'un facteur 100 et plus, le nombre de microorganismes à la surface des trayons.

4.2. L'environnement des animaux

Les litières

Différents matériaux comme la paille, la sciure, les copeaux de bois ou le papier, peuvent être utilisés comme litière. Comme nous l'avons indiqué précédemment, des différences de concentration microbienne ont été mises en évidence selon la nature de la litière. Ainsi, Rendos *et al.* (1975) ont montré que la paille présentait des niveaux en streptocoques et en staphylocoques 10 à 100 fois plus élevés que ceux dénombrés sur la sciure ou les copeaux de bois. Les niveaux de coliformes sont supérieurs pour la sciure à ceux des copeaux de bois et de la paille (tableau 14). La source des microorganismes est mal définie. Ces microorganismes peuvent provenir des matériaux utilisés comme litière ou d'autres sources de contamination comme les déjections ou la peau des animaux.

Tableau 14 : Répartition des microorganismes dans les litières (ufc.g⁻¹) et les trayons de vaches (ufc/trayon) après 1 à 3 semaines d'utilisation des litières (Rendos *et al.*, 1975)

		Sciure	Copeaux de bois	Paille
Coliformes Totaux	Litières	$5,2 \cdot 10^7$	$6,6 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^6$
	Trayons	127	12	8
Streptocoques dont entérocoques	Litières	$5,3 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^6$
	Trayons	2064	717	383
Staphylocoques (dominance SCN)	Litières	$2,2 \cdot 10^9$	$3,1 \cdot 10^8$	$4,9 \cdot 10^7$
	Trayons	9064	7218	1366

Litières : n=9 ; Trayons : n=270 SCN : Staphylocoques a coagulase négative

D'après Reboux *et al.* (2001), la paille renferme entre 10^4 et 10^5 \log_{10} ufc.g⁻¹ de moisissures et d'actinomycètes. Parmi les 27 espèces de moisissures recensées par ces auteurs, *Absidia corymbifera*, *Eurotium amstelodami*, *Wallemia sebi*, *Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus nidulans* constituent les 5 espèces les plus représentées avec quatre espèces de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (*Lactobacillus coryniformis*, *L. curvatus*, *L. paraplantarum* et *L. plantarum*). Comme on peut le constater, certaines de ces espèces ne sont pas majoritairement retrouvées au niveau des laits et fromages (notamment les moisissures), démontrant un tropisme particulier de certains microorganismes de l'environnement.

Les résultats de Ménard *et al.* (2004) indiquent que la contamination de la litière paillée, après utilisation, est supérieure à celle des bouses. Ceci suppose le développement microbien en surface des aires paillées, notamment pendant les douze premières heures de paillage. Il semble donc qu'un paillage biquotidien soit à privilégier pour limiter le développement des microflore d'altération ou potentiellement pathogènes.

Ainsi, les niveaux des populations en coliformes, streptocoques (dont entérocoques) et staphylocoques augmentent avec des taux pouvant aller de 10 à 10^6 selon les matériaux utilisés et les microorganismes (Rendos *et al.*, 1975 ; Ménard *et al.*, 2004 ; Zdanowicz *et al.*, 2004).

Les substrats d'alimentation

Tout comme la paille, le foin contient des populations de moisissures et d'actinomycètes comprises entre 10^4 et 10^5 ufc.g⁻¹ (Reboux *et al.*, 2001). Les espèces majoritaires sont celles rencontrées dans la paille. Le niveau moyen des bactéries se situe autour de 10^3 ufc.g⁻¹. On trouve essentiellement des bacilles Gram positif appartenant aux genres *Bacillus* et *Corynebacterium*, ainsi que des coques Gram positif. Parmi la microflore Gram positive, des lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (*L. amylovorus*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. paraplantarum*, *L. plantarum*) et des bactéries propioniques (*P. freudenreichii*) ont été détectés (Bouton *et al.*, 2007 ; Bouton, communication personnelle).

Dans les prairies de Normandie, des niveaux importants de *Pseudomonas* (10^6 à 10^8 ufc.g⁻¹ de végétaux) et d'entérobactéries (10^4 à 10^7 ufc.g⁻¹ végétaux) ont été retrouvés. Parmi les microflore d'intérêts, les bactéries corynéformes (10^3 à 10^7 ufc.g⁻¹) ainsi que des levures (10^3 à 10^6 ufc.g⁻¹) étaient bien représentées, alors que les bactéries lactiques l'étaient

moins. Seul, le génotype *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a été retrouvé sur les végétaux. Bouton *et al.* (2007) ont détecté plusieurs espèces de lactobacilles (*L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. paraplantarum*) dans des échantillons d'herbe et de betterave fourragère après stockage.

L'air et la poussière

L'air peut être un vecteur potentiel des flores des litières et ensemercer le lait pendant la traite.

Dans les étables de vaches laitières, c'est la flore fongique ainsi que les actinomycètes qui dominent. Les niveaux des populations varient entre 10^3 et 10^6 ufc.m⁻³ d'air (Reboux *et al.*, 2001 ; Sudre *et al.*, 2009). Les principaux genres recensés sont *Eurotium*, *Wallemia*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Absidia* et *Mucor*. Des levures pigmentées (*Rhodotorula*) et non pigmentées (*Candida* spp., *Cryptococcus* spp., et *Debaryomyces* spp.) ont également été retrouvées dans l'air des étables.

Des bactéries se retrouvent également dans l'air, mais à des niveaux moindres (niveau de la microflore aérobie revivifiable de 10^4 ufc.m⁻³ en moyenne). Ces bactéries sont majoritairement des bactéries Gram positif (75 à 90%). Les bacilles Gram négatif sont sous-dominants (10 à 25%). Les espèces appartenant aux genres *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. représentent plus de 70% des espèces recensées (Normand *et al.*, 2009, Sudre *et al.*, 2009). Parmi les diverses bactéries identifiées dans l'air ou la poussière sédimentée, nombreuses sont celles retrouvées à la surface des fromages : *Staphylococcus equorum*, *S. xylosus*, *Brachybacterium* spp., *Corynebacterium* spp., *Curtobacterium* spp. (Denis et Desmasures, 2005 ; Normand *et al.*, 2009 ; Sudre *et al.*, 2009).

Pratiques influençant les populations microbiennes de l'environnement des animaux

L'entretien de la litière a une influence sur le niveau des microflores. Ainsi, Ménard *et al.* (2004) ont montré qu'un paillage biquotidien comparé à un paillage quotidien diminuait le niveau de contamination des *E.coli* et des entérocoques à la surface des litières. Pour des densités animales moyennes, l'utilisation de produits asséchants des litières comme la bentonite (0,5kg.m⁻²), associée à un renouvellement des litières toutes les 4 semaines, diviserait en moyenne par 3 la teneur en germes totaux et les flores dites d'altérations (levures et moisissures, psychrotrophes) des laits crus (Sévi *et al.*, 2002). Ceci est

également valable pour les fromages associés, les aptitudes technologiques des laits étant également améliorées.

Albenzio *et al.* (2005) ont montré qu'une augmentation du taux de renouvellement d'air de l'aire de couchage des animaux diminuait significativement le niveau de flores d'altérations des laits : le passage d'un taux de renouvellement de $30 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ à $70 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ permet d'obtenir des niveaux de flores d'altérations (coliformes et psychrotrophes) 10 à 100 fois inférieurs.

La composition de l'air varie en fonction des différents substrats manipulés. Ainsi, il a été observé une augmentation du nombre des moisissures et des actinomycètes dans l'air au moment de la distribution de foin (Reboux *et al.*, 2006, Sudre *et al.*, 2009). Par contre, aucun lien entre la flore bactérienne aérobie mésophile de l'air et les pratiques d'affouragement n'a été constaté (Sudre *et al.*, 2009). Le foin ne semble donc pas être la source majeure de bactéries.

La bibliographie montre que la nature de la litière, son entretien ainsi que le renouvellement d'air de l'aire de couchage influencent les niveaux des microflore des laits. D'autre part, des études ont pu mettre en évidence quelques souches identiques dans l'environnement des animaux (substrats d'alimentation, poussières, bouses) et dans le lait (Denis et Desmasure, 2005 ; Bouton *et al.*, 2007 ; Kagkli *et al.*, 2007). Ces données renforcent l'hypothèse que l'environnement des animaux est une source d'ensemencement en microorganismes des laits. Cependant, d'autres études nécessitent d'être menées afin de préciser les espèces microbiennes concernées, leur mode éventuel de transfert vers le lait, leur tropisme pour le lait (toutes ne s'y installent pas) et l'enchaînement des pratiques influençant ce transfert.

4.3. La machine à traire

4.3.1. Les microorganismes mobilisés au niveau de la machine à traire

Des corrélations ont pu être établies entre les niveaux de flore totale, et certains microorganismes des laits de traite et des laits stériles ayant circulé dans la machine à traire dans des exploitations caprines (Laithier *et al.*, 2004a). D'autre part, une étude réalisée en Franche-Comté sur 16 fermes bovines, a permis de mettre en évidence des souches identiques dans le lait et dans les manchons de la machine à traire (Bouton *et al.*, 2007).

Cette transmission est liée à une contamination des certaines parties de la machine à traire, avec notamment formation de biofilms¹. Ceux-ci constituent alors un réservoir permanent de microorganismes qui peuvent se détacher et ensemençer le lait. Selon les techniques de nettoyage, l'occurrence de ces biofilms est plus ou moins importante. La nature des microflores qui le composent peut également varier en fonction des pratiques de nettoyage (Laithier *et al.*, 2005b).

Les études publiées sur l'impact du nettoyage de la machine à traire sur la composition microbienne des laits sont peu nombreuses ou datent de plus de vingt années.

Plus récemment, deux études ont été menées l'une portant sur les laits de vache (Michel *et al.*, 2005), l'autre sur les laits de chèvre (Laithier *et al.*, 2005a, Laithier *et al.*, 2005b). Dans les exploitations bovines de Savoie, les groupes microbiens mobilisés par rinçage de la machine à traire ne sont pas très diversifiés. Sur les 12 groupes microbiens recherchés, seuls 4 ont été isolés et avec des niveaux relativement faibles (< 100 ufc.ml⁻¹ d'eau) dans 80% des cas. De plus, les coliformes et *Pseudomonas* ont été retrouvés dans la majorité des cas à des niveaux similaires à ceux des microflores d'intérêt technologique. Dans certains cas, une mobilisation importante de germes (plus de 1000 fois supérieure aux niveaux moyens) a été observée, démontrant un risque de relargage ponctuel plus important et non maîtrisé. Les défauts d'entretien et/ou de lavage du matériel ont été incriminés. Parallèlement, une étude réalisée sur 16 fermes de Franche-Comté (Bouton *et al.*, 2007) fait état d'un réservoir potentiel de lactobacilles hétérofermentaires facultatifs (microflore d'affinage) dans la machine à traire.

En élevage caprin, les résultats sont plus nuancés. La diversité des groupes microbiens mobilisés par passage de lait UHT dans la machine à traire est plus importante que pour l'étude menée avec du lait de vache. Les microflores utiles (flore acidifiante, microcoques et corynébactéries) sont majoritaires, avec néanmoins une dominance des entérocoques (typage phénotypique). Cependant, les microflores d'altérations et les staphylocoques à coagulase positive sont d'autant plus présents que le niveau de la flore totale est élevé (fig. 3). Il est probable que ces différences de résultats entre les études menées en bovin et caprin soient liées en partie aux méthodes de prélèvements des biofilms qui diffèrent : passage d'eau stérile dans la machine à traire (bovin) et de lait UHT pour les études menées en caprin.

¹ Il s'agit de communautés microbiennes immobilisées sur une surface et souvent enfouies dans une matrice de polymères extracellulaires (Carpentier et Cerf, 1993)

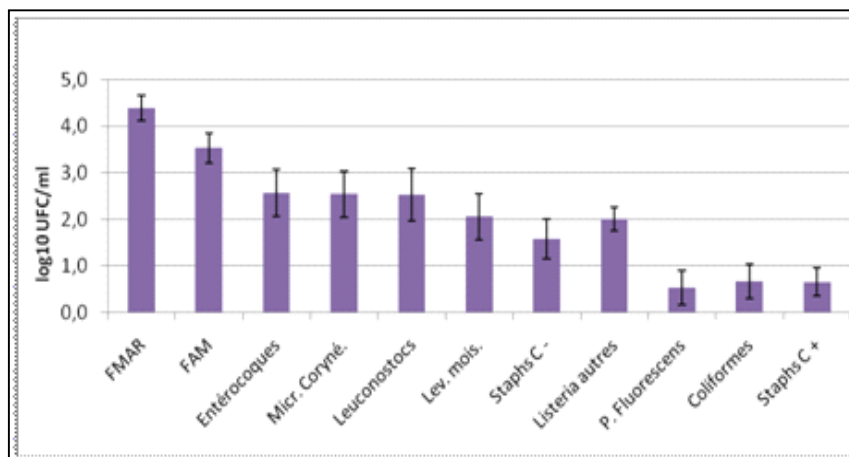


Figure n° 3 : Dénombrements effectués sur les laits UHT à la sortie de la machine à traire d'élevages caprins d'après Laithier *et al.* (2005a). FMAR : Flore Mésophile Aérobie Revivifiable
FAM : Flore Acidifiante Mésophile

Laithier *et al.* (2005a) se sont également intéressés à la diversité des microorganismes rencontrés à différents niveaux de la machine à traire. La composition microbienne des biofilms varie selon que les prélèvements sont effectués au niveau des manchons, du bocal de réception du lait, du lactoduc ou de la vanne du tank et selon les matériaux (caoutchouc, verre). Les zones peu accessibles au nettoyage, comme par exemple la vanne du tank de stockage du lait, ont des biofilms dont les niveaux de microflore (d'intérêt comme d'altération) sont élevés. Le transfert du lactoduc peut également être chargé en microflore. En revanche, les bords de réception du lait en verre sont peu chargés en microflore.

La nature des manchons influe sur le niveau de microflore. Ainsi, les manchons en silicone présentent des niveaux très bas avec une diversité moindre (microflore acidifiante mésophile et *Pseudomonas* non détectés).

4.3.2. Facteurs influençant la formation de biofilms au niveau de la machine à traire

La conception de la machine à traire peut avoir une influence sur les niveaux et la nature des microorganismes formant un biofilm dans la machine à traire. Ainsi, Michel *et al.* (2001) ont montré qu'une installation de traite comprenant de grandes longueurs de canalisations (supérieures à 12 m) risque d'apporter un plus grand nombre de germes dans le lait. Le risque d'inefficacité des traitements de nettoyage et de désinfection augmente

avec la surface de contact, et donc de contamination, les niches microbiennes (zones les moins accessibles) étant plus nombreuses.

La nature des matériaux a également son importance. Ainsi, les surfaces non poreuses, comme l'inox et le verre, ou plus hydrophobes (verre) sont moins favorables au développement des biofilms (Laithier *et al.*, 2005a).

Des imperfections dans le nettoyage et l'entretien des machines à traire sont encore rencontrés actuellement. Dans plus de 25% de l'ensemble des suivis réalisés sur 30 exploitations bovines, le rinçage de la machine à traire se traduit par une mobilisation importante des microorganismes (1000 fois plus qu'en moyenne) de la machine à traire (Michel *et al.*, 2005).

D'une manière générale, lorsque le nettoyage de la machine à traire est strict (températures de nettoyage élevées au delà des recommandations du Comité Français Interprofessionnel pour les techniques de production du lait), les laits sont peu chargés en microorganismes (Michel *et al.*, 2001). L'alternance systématique de produits de nettoyage acide et basique réduit le pouvoir contaminant de la machine à traire, mais tend par ailleurs à donner des laits plus riches en coliformes et en *Pseudomonas* (Chatelin et Richard, 1983 ; Michel *et al.*, 2001). Ces dernières observations soulignent l'importance de maintenir un équilibre dans les flores présentes et de ne pas provoquer, par une hygiène trop poussée, la prolifération de microorganismes à risques.

L'influence des techniques de nettoyage de la machine sur les microorganismes du lait a conduit Laithier *et al.* (2005a) à rechercher des méthodes de nettoyage favorisant l'installation dans la machine à traire de biofilms composés majoritairement de microflore d'intérêts technologiques. Parmi les différentes méthodes testées, l'emploi d'un détergent alcalin additionné de sulfate de sodium (Na_2SO_4) en petite quantité (0,05%) donne des résultats plutôt intéressants en laboratoire. Cependant, lorsque cette formulation est appliquée en élevage, les résultats sont plus mitigés. En effet, bien que l'aptitude à l'acidification des laits de traite soit améliorée, le développement de *Pseudomonas* dans les biofilms a été mis en évidence dans certains cas. Il faut donc considérer que la contamination d'une machine à traire est spécifique de l'ensemble des pratiques de l'élevage, et non pas d'une seule comme le nettoyage de la machine à traire par exemple conduisant à l'installation d'un biofilm spécifique.

5 - INFLUENCE DE COMBINAISONS DE PRATIQUES SUR LA COMPOSITION MICROBIENNE DES LAITS

Comme développé précédemment, plusieurs facteurs d'exploitation sont susceptibles de modifier quantitativement et qualitativement la flore naturelle du lait. Cependant, considérer ces facteurs séparément présente peu d'intérêt et il semble plus judicieux de se replacer dans une logique d'élevage et de s'intéresser aux « combinaisons de pratiques » pouvant avoir une influence sur la composition microbienne des laits.

Peu d'études ont été menées à ce sujet et le présent travail s'appuie principalement sur les résultats obtenus par Michel *et al.* (2005) et Verdier-Metz *et al.* (2009) dans une étude portant sur des élevages bovins de Savoie et de Haute Savoie.

En production laitière bovine, la structure de l'exploitation (type de bâtiment, matériels de traite) ne semble pas avoir d'impact sur la qualité microbiologique des laits. Il est possible de produire des laits riches en flore totale et à faible niveau de staphylocoques potentiellement pathogènes, dans tous les types de structure, stabulation avec salle de traite ou étable entravée avec lactoduc (Michel *et al.*, 2001). Il y a également peu de relation entre la taille du troupeau et la composition en microorganismes du lait (Jayarao *et al.*, 2004). Mais ceci est moins vrai en production laitière caprine où la taille des troupeaux peut varier considérablement, conditionnant ainsi les conduites d'élevage et les conditions de production.

5.1. Combinaisons de pratiques et importance des groupes microbiens

En Savoie et en Haute-Savoie, 90 exploitations bovines ont fait l'objet d'un suivi (relevé des pratiques d'élevage et analyses microbiologiques des laits). Quatre combinaisons de pratiques ont été mises en évidence et peuvent être qualifiées de plus ou moins « sécuritaires » (Michel *et al.* 2005).

Ces combinaisons se différencient par trois critères principaux : hygiène des trayons, lavage de la machine à traire et hygiène générale.

Le premier type de pratiques (Pratique A) se caractérise par un nettoyage des trayons avant la traite à l'aide de produits désinfectants ou de douchettes. Après la traite, les trayons sont systématiquement désinfectés. Le matériel de traite, correctement entretenu, est lavé après chaque traite par alternance systématique de produits de nettoyage détergents et détartrants.

Ce type de pratiques se caractérise par de bonnes conditions d'hygiène générale de l'environnement et des animaux.

Le second type de pratiques (Pratique B) se traduit par des mesures d'hygiène moins drastiques. Le nettoyage des trayons est individualisé, mais il est réalisé au moyen d'une lavette, les trayons sont également désinfectés après la traite. Par contre, le lavage de la machine à traire n'est réalisé qu'une fois par jour, la traite du soir étant suivie d'un simple rinçage à l'eau. Les critères permettant de juger l'hygiène générale sont satisfaisants, mais à un degré moindre que pour le type A.

Les pratiques de type C (Pratique C) se caractérisent principalement par une hygiène minimale des trayons : pas de préparation avant la traite ou réalisation d'un simple essuyage à sec, pas de désinfection après la traite. Le matériel de traite est le plus souvent lavé une seule fois par jour ; lorsque le lavage est biquotidien, il se différencie alors de celui du type A par une fréquence moindre d'utilisation de détartrants (produit de nettoyage acide). L'hygiène générale dans ces exploitations est voisine de celle du type B.

Enfin, les pratiques de type D (Pratique D) sont caractérisées par la réalisation d'un lavage des trayons avant la traite, mais non individualisé, une même lavette servant pour plusieurs vaches laitières. Les trayons sont désinfectés après la traite. Comme dans le cas des pratiques de type B, le matériel de traite n'est lavé qu'une fois par jour. Par contre, ce type de pratiques se distingue des autres par des critères d'hygiène générale jugés non satisfaisants.

Les pratiques de types A et B sont principalement associées à la production de laits avec de faibles niveaux de flore mésophile aérobie totale (moins de 5000 ufc.ml⁻¹) et à bas niveau de staphylocoques à coagulase positive (moins de 120 ufc.ml⁻¹) : ces derniers représentent entre 50% et 60% des types de laits produits avec ces combinaisons de pratiques.

Les pratiques de types C et D sont, quant à elles, principalement associées aux laits à plus hauts niveaux de flore mésophile aérobie totale (entre 15 et 30 000 ufc.ml⁻¹), ces derniers représentant 67% et 56% des laits produits, respectivement.

D'autre part, la caractérisation des pratiques produisant des laits à haut niveau de *Pseudomonas* (plus de 10% de la flore totale) fait apparaître l'utilisation de quantités d'eau importantes lors de la traite (lavage des trayons au moyen de douchettes), ainsi qu'un entretien non satisfaisant du matériel de stockage (le tank pouvant être lavé plusieurs heures après son ramassage ou de manière non satisfaisante). Ceci est en accord avec des résultats récents montrant que l'eau est souvent une source majeure de contamination des laits par les *Pseudomonas* (Leriche *et al*, 2004).

Ces travaux ont donc permis de préciser certaines associations existant entre combinaisons de pratiques de traite (hygiène des trayons, lavage du système de traite, environnement des vaches laitières) et composition microbienne des laits. Une étude sur lait de vache menée par Elmoslemany *et al.* (2009 b) corrobore ces résultats. Les laits des tanks de 235 exploitations ont été analysés. Des niveaux plus importants de flores mésophiles aérobies revivifiables sont principalement associés à l'hygiène des trayons et au lavage du système de traite (température de nettoyage faible, eau dure, pH élevé de produit de nettoyage de la machine à traire). Dans cette même étude, les niveaux de coliformes, également plus élevés, sont corrélés avec les pratiques de nettoyage de la machine à traire.

5.2. Combinaisons de pratiques et diversité des espèces microbiennes

Dans le cadre d'une étude menée dans des élevages de Savoie et Haute-Savoie par Verdier-Metz *et al.* (2009), trois groupes de laits issus de ces exploitations se distinguent par leur diversité d'espèces (tableau 15).

Tableau 15 : Espèces et niveaux de flore bactérienne totale des laits issus de trois groupes (Verdier-Metz *et al.*, 2009)

Groupes de lait	E	F	G	
Effectif	20	19	28	
Indice moyen de diversité microbienne (1)	0.88e	1.09f	1.18g	***
Flore Mésophile Aérobie Revivifiable (Ufc.ml ⁻¹)	6310e	5012e	15 849f	***

Les nombres affectés des lettres e, f, g sont significativement différents (test de Newman-Keuls au seuil de 0,1%).

Indice de diversité : indice de Shanon (Verdier-Metz *et al.*, 2009)

Les indices de diversité sont croissants du groupe E au groupe G.

Pour les laits du groupe E, la proportion de bactéries d'affinage (bactéries corynéformes) est la plus importante.

Le groupe F présente une plus forte proportion de bactéries Gram négatif (*Acinetobacter*) et de bactéries lactiques (*Lactococcus lactis*). Ce même groupe se différencie par une plus

grande diversité des populations microbiennes que le groupe E. Le niveau de flore totale est similaire.

Le groupe G se distingue par un niveau de flore totale significativement plus élevé ($p < 0,001$) et par la présence de staphylocoques et de bactéries lactiques (*Leuconostoc* spp.).

Les combinaisons de pratiques des exploitations du groupe E se caractérisent par des hauts niveaux d'hygiène sur l'ensemble de l'exploitation. Les trayons sont plus fréquemment lavés puis essuyés avant la traite. Le post-trempage est plus fréquemment réalisé. Le nettoyage de la machine à traire est plus intense (température et turbulence plus importantes) et la propreté du tank, ainsi que celle de la laiterie, est satisfaisante. L'hygiène générale (propreté du sol de la salle de traite, du couloir d'alimentation, aération du bâtiment) est plus satisfaisante que pour les autres groupes de lait.

Pour le groupe F, les pratiques d'hygiène des mamelles, le lavage de la machine à traire et la propreté générale de la salle de traite sont moins strictes et sont jugées plutôt non satisfaisantes.

Les exploitations appartenant au groupe G sont caractérisées par les pratiques les moins hygiénistes, tant au niveau de l'hygiène des mamelles que de la propreté en général (salle de traite, lavage du matériel de traite).

La diversité des espèces semble donc dépendre des pratiques d'élevage, allant des soins apportés aux mamelles au nettoyage de la machine à traire et de l'hygiène de l'environnement autour des animaux. La raréfaction des microflore d'intérêt technologique dans certains laits, et en particulier les bactéries lactiques, peut donc être en partie rattachée à des pratiques jugées sécuritaires. Par contre, il est plus difficile de conclure pour le niveau de flores totales. En effet, les niveaux sont similaires pour des pratiques jugées sécuritaires (groupe E) et des pratiques moins hygiénistes (groupe F). Ce résultat va à l'encontre des travaux précédemment cités (Michel *et al.*, 2005 ; Elmoslemany *et al.*, 2009b).

Synthèse de la bibliographie

Parmi les grands groupes microbiens dénombrés dans les laits crus, les staphylocoques et les bactéries corynéformes ainsi que les bactéries lactiques sont systématiquement mis en évidence. Globalement, en France, les microflores d'intérêts technologiques sont à des niveaux plus élevés que les microflores d'altérations. Cette tendance dépend cependant des élevages et des pratiques de production du lait. La saison est parfois citée, les niveaux de microflores les plus élevés étant souvent retrouvés aux périodes les plus chaudes (printemps, été). Cependant, les pratiques peuvent être différentes selon les saisons, rendant difficile la distinction des impacts respectifs. La nature de la litière, son entretien ainsi que le renouvellement d'air dans l'aire de couchage influencent les niveaux des microflores des laits. L'existence de souches identiques (comme par exemple des souches appartenant aux espèces des lactobacilles du groupe II) dans l'environnement des animaux et dans le lait tend à confirmer que l'environnement des animaux est une source d'ensemencement en microorganismes des laits. Les conditions d'hygiène à la surface des trayons modifient les niveaux des microflores des laits crus. Des pratiques d'hygiène des trayons allégées augmentent les niveaux sans pour autant élever celui des staphylocoques à coagulase positive. Quant à la machine à traire, la longueur des canalisations, les conditions de nettoyage (températures, nature et formulation du détergent) sont des éléments influençant les niveaux des différentes microflores fréquemment rencontrées dans les laits.

Mais ce sont avant tout, les combinaisons de pratiques (hygiène des trayons et de la machine à traire, notamment) qui influencent les niveaux des microflores et la diversité des espèces bactériennes.

6 - OBJECTIF DE LA THESE

Aujourd'hui, face à la diminution du nombre d'exploitations en production laitière et en fabrication fromagère fermière (Agreste Graphagri, 2007), la profession et les scientifiques se mobilisent pour identifier les leviers d'actions qui assureront la pérennité de ce secteur. La spécificité sensorielle des fromages fermiers est un élément fort de différenciation de ces produits par rapport aux fromages élaborés à partir de lait pasteurisé. Un constat est récurrent depuis une vingtaine d'années, celui de l'appauvrissement des microflore des laits crus (Montel *et al.*, 2003 ; Michel *et al.*, 2005). L'impact de la microflore des laits crus sur la qualité sensorielle des fromages a été démontré dans de nombreuses études (Demarigny *et al.*, 1997, Buchin and Beuvier, 2000, Verdier-Metz *et al.*, 2005). Certains travaux menés sur du lait de vache par Bouton *et al.* (2005), Michel *et al.* (2005), Verdier-Metz *et al.* (2009) établissent des relations entre conditions d'élevage et de production du lait et équilibres microbiens des laits (niveaux de flores, équilibre entre microflore d'intérêt technologique et indésirables, nombre et nature des espèces bactériennes). Ces pratiques sont les soins apportés aux mamelles et au nettoyage de la machine à traire, l'hygiène de l'environnement autour des animaux.

La raréfaction des microflore d'intérêt technologique dans certains laits, et en particulier les bactéries lactiques, a pu être, en partie, reliée à des pratiques jugées sécuritaires (Verdier-Metz *et al.*, 2009). Les quelques études sur lait de chèvre menées dans un nombre restreint d'exploitations portent sur la caractérisation des microflore des laits crus (Alonso-Calleja *et al.*, 2002, Foschino *et al.*, 2002, Callon *et al.*, 2007). L'origine de la variabilité des caractéristiques microbiologiques des laits est très peu abordée.

Ainsi, à la demande de deux filières professionnelle locales, l'AOP Rocamadour et l'AOP Pélardon, ainsi que quelques exploitations fromagères fermières de Franche-Comté, l'objectif de ce travail est d'identifier des leviers permettant d'obtenir, dans les élevages, des laits dont les équilibres microbiens sont en faveur des microflore d'intérêt technologique et des bactéries lactiques en particulier.

La démarche entreprise est exploratoire. Elle consiste à apprécier la diversité microbienne des laits de chèvre issus d'un grand nombre d'exploitations. Cette diversité microbienne sera étudiée selon différents niveaux de spécificité : grands groupes microbiens, espèces

dominantes, sous-espèces de bactéries lactiques en se basant sur différentes techniques d'isolement et de caractérisation microbiennes.

Dans une deuxième étape, il s'agit d'étudier les liens possibles entre cette diversité microbienne, les conditions d'élevage (sur la base d'un questionnaire et d'observations), la saison (printemps, hiver) et la zone géographique.

Ce travail aboutit à des recommandations concernant les pratiques d'élevage et de production de lait.

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

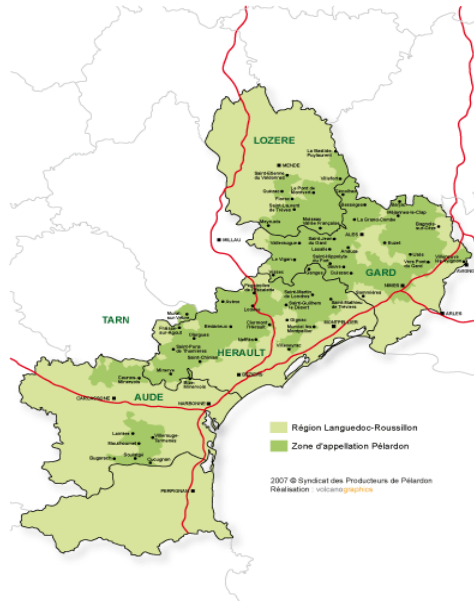


Figure 4 : Zone géographique de l’AOP Pélardon (source : Syndicat des producteurs de Pélardon)

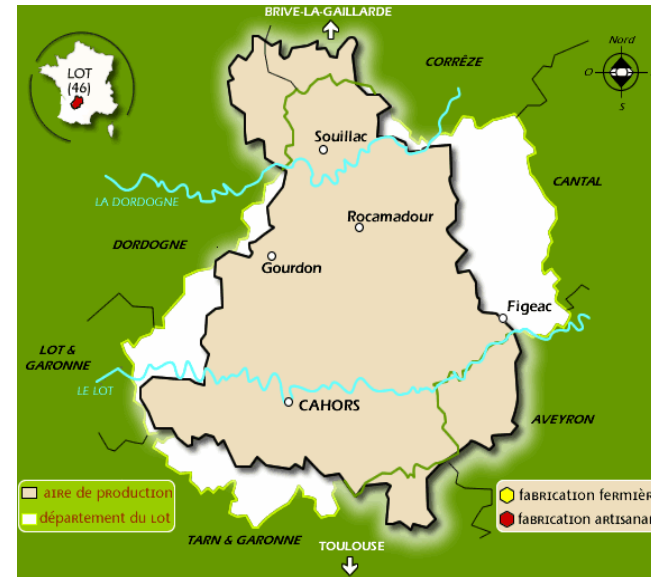


Figure 5 : Zone géographique de l’AOP Rocamadour (source : Syndicat des producteurs de fromages Rocamadour)



Figure 6 : Délimitation du territoire de Franche Comté

1 - CHOIX DES EXPLOITATIONS ET DE LA SAISON

Les exploitations sélectionnées sont localisées dans trois zones géographiques :

- celle de l'AOP fromagère Rocamadour (figure 5) : son terroir couvre les Causses du Quercy, soit une zone qui s'étend sur la majeure partie du département du Lot et quelques communes de l'Aveyron, de Corrèze, de Dordogne et du Tarn-et-Garonne.
- celle de l'AOP fromagère Pélardon (figure 4) qui s'étend sur les départements de l'Hérault (Montagne Noire, garrigues), du Gard (Cévennes et garrigues), de la Lozère (Cévennes) et de l'Aude (corbières audoises).
- Franche-Comté : exploitations fromagères fermières des départements de la Haute-Saône, du Doubs et du Jura (figure 6).

La taille moyenne des élevages varie d'une zone à une autre (50 chèvres pour les élevages de Franche-Comté, 80 chèvres pour les élevages de l'AOP Pélardon, 180 chèvres pour les élevages de l'AOP Rocamadour). Ceci laisse supposer quelques différences dans la conduite de l'élevage et la production de lait, et donc une exhaustivité plus large de l'étude dans la perspective des recommandations envisagées.

Les exploitations ont été sélectionnées par les techniciens fromagers de chacune des zones concernées sur la base de leur représentativité des caractéristiques d'élevage. Le nombre d'exploitations suivies représente au minimum 25% des exploitations fermières fromagères caprines de chacune des zones concernées (20 exploitations pour l'AOP Rocamadour, 18 exploitations pour l'AOP Pélardon, 4 exploitations pour la zone Franche-Comté).

Les périodes de suivi se répartissent comme suit :

- Le printemps (Mai-Juin 2006) : La température moyenne se situe entre 18 et 25°C. La plupart des troupeaux sont à l'extérieur (34 exploitations sur les 42 exploitations). Le stade de lactation est de 3 à 5 mois pour 80% des troupeaux suivis.
- L'hiver (Février-Mars 2007) : La température moyenne se situe entre 10 et 18°C pour les régions Languedoc Roussillon et Rocamadour et de 10°C pour la région Franche Comté. Tous les troupeaux sont dans les chèvreries. Le stade de lactation est en moyenne de 1 mois pour la majorité des élevages (80% des élevages).

2 - ENQUETES, OBSERVATIONS EN ELEVAGE

Dans chacune des fermes et pour chacune des saisons, une enquête, des observations et des prélèvements d'échantillons ont été réalisés. Ces relevés ont été effectués pour chacune des zones par un même enquêteur formé par les techniciens des zones AOP Rocamadour et Pélardon et par un ingénieur de l'Institut de l'Élevage ayant déjà mené des études avec les éleveurs de Franche-Comté. Les enquêtes réalisées en Franche-Comté n'ont été réalisées qu'au printemps 2006. Les laits de ces exploitations ont été analysés uniquement au niveau de la diversité spécifique des bactéries lactiques mésophiles (partie V). Il s'agissait principalement de valider les résultats obtenus sur une autre région où les conditions climatiques et les conditions de production de laits sont différentes (traites en pot trayeur pour les élevages de Franche-Comté, traite en lactoduc pour les élevages des zones AOP Rocamadour et Pélardon).

Un comité technique constitué des techniciens d'élevage, de chercheurs du laboratoire de microbiologie de Purpan a été chargé d'élaborer le questionnaire. Au total, trois cents questions de divers types ont été formulées et la saisie des données effectuée sur le logiciel SPHINX V.5.

Différents aspects ont été investigués, débouchant sur des indicateurs renseignant sur :

- la structure des bâtiments d'élevage et la composition du cheptel,
- la nature des pratiques d'élevage et de production effectuées en relation avec chaque source potentielle de microflores, depuis l'animal jusqu'au matériel de réception du lait,
- l'évaluation de ces pratiques (hygiène des litières, conditions de nettoyage de la machine à traire, état sanitaire des trayons).

Les variables d'élevage retenues pour l'analyse, sont décrites dans le chapitre III.

3 - PRELEVEMENT DES LAITS ET CONDITIONS DE STOCKAGE

Pour chaque saison, des prélèvements de laits issus d'une traite ont été réalisés. Ces prélèvements sont effectués en fin de traite, après brassage du mélange de lait de traite soit mécaniquement dans le tank de stockage du lait (AOP Rocamadour et Pélardon) soit par prélèvement, à l'aide de flacons stériles muni d'une anse, d'un volume de lait identique dans chacun des bidons de lait de Franche-Comté.

Questionnement	Méthode d'analyse	Nombre d'exploitations	Nombre d'échantillons
Quels sont les groupes microbiens majoritaires et minoritaires des laits crus de chèvre ?	Méthode culture dépendante : Dénombrement sur boîte de Pétri (12 grands groupes microbiens) Confirmation au rang du genre : Staphylococcus , Leuconostocs par tests phénotypiques Entérocooccus, lactococcus par tests phénotypiques et méthodes PCR <i>Méthodologie décrite dans la publication du chapitre III</i>	Printemps 2006 : 38 dont 20 (AOP Rocamadour), 18 (AOP Pélardon), Hiver 2007 : 38 dont 20 (AOP Rocamadour), 18 (AOP Pélardon).	114 laits 114 laits
Quelles sont les espèces dominantes des laits crus de chèvre ?	Méthode par culture indépendante : Temperature/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (TTGE/DGGE) <i>Méthodologie décrite dans la publication du chapitre IV</i>	Printemps 2006 : 30 dont 19 (AOP Rocamadour) et 11 (AOP Pélardon)	90 laits
Quelles sont les espèces dominantes de bactéries lactiques mésophiles ?	Méthode culture dépendante : Prélèvement de colonies sur milieu Elliker modifié selon Chamba <i>et al.</i> (1981) Typage par tests phénotypiques, profils des protéines et méthodes PCR <i>Méthodologie décrite dans la publication du chapitre V</i>	Printemps 2006 : 21 exploitations dont 11 (AOP Rocamadour), 6 (AOP Pélardon), 4 (Franche Comté)	206 isolats issus de 21 laits. Les laits analysés sont ceux prélevés à J+4

Afin de ne prendre en compte que les facteurs liés aux caractéristiques et pratiques d'élevage, nous avons choisi de prendre le lait d'une seule traite et non de plusieurs afin de s'affranchir des effets du stockage à basse température sur la flore microbienne des laits.

Trois échantillonnages de laits sont effectués pour chacune des saisons et chaque élevage, excepté pour ceux de Franche-Comté pour lesquels les prélèvements n'ont été réalisés qu'au printemps 2006.

Ces échantillons correspondent à des traites espacées de 4 jours pour chacune des saisons. Pour chacun des échantillons, trois prélèvements de 90 ml de laits sont effectués, immédiatement refroidis à 10°C, puis congelés à -25°C et conservés pour une durée maximale de 1 mois.

Chacun des prélèvements est codifié de la manière suivante : n° d'exploitations et lettre (A, B, C), année.

A : premier prélèvement : jour J ;

B : deuxième prélèvement : J+4j ;

C : Troisième prélèvement : J+8j.

4 - ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DES ECHANTILLONS

Le protocole de préparation et d'analyse des échantillons est décrit en détail dans les publications des chapitres III, IV et V.

Ne seront présentées ici et de manière synthétique, que la démarche et les méthodes d'analyses utilisées (Tableau 16). Les exploitations suivies pour l'évaluation des espèces majoritaires des laits et l'analyse plus spécifique des bactéries lactiques sont les mêmes que pour la détermination et la quantification des grands groupes microbiens.

Les grands groupes microbiens et certains genres ou espèces spécifiques ont été étudiées par méthodes culturales classiques : dénombrement et isolement sur milieux spécifiques ou d'enrichissement, caractérisation phénotypique.

La détection des espèces microbiennes a été réalisée par la méthode TTGE (Temporal Temperature Gel Electrophoresis) et DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Ces techniques sont basées sur l'analyse directe de l'ADN (ou de l'ARN) et ne demandent donc pas d'enrichissement préalable des cellules microbiennes. De fait, elles permettent d'avoir une description plus précise des écosystèmes complexes comme le lait cru. Le principe de ces méthodes est le suivant :

L'ADN est extrait à partir d'échantillons issus du lait et une zone correspondant à une fraction du gène ARNr 16s est amplifiée. La variation des nucléotides dans ces séquences conservées est la base de la séparation des espèces bactériennes réalisée pendant l'électrophorèse. Pour les espèces bactériennes à bas GC% (T_m de la séquence V3 < 75°C), la résolution optimale est obtenue par TTGE. Pour les bactéries avec un contenu en G+C (%) moyen ou fort (T_m de la séquence V3 > 75°C), la meilleure séparation est obtenue par DGGE. Le détail du protocole est reporté en annexe.

5 - TRAITEMENT DES DONNEES

5.1. Effet de la saison sur l'importance des différents groupes microbiens dénombrés

Le traitement des données est décrit dans la publication du chapitre III du document.

L'effet de la saison sur l'importance relative des groupes microbiens dénombrés est évalué en utilisant un modèle mixte d'analyse de variance (SAS 9.1, USA).

Les variables dépendantes sont les niveaux des différents groupes microbiens dénombrés (exprimés en \log_{10} ufc.ml⁻¹), les variables indépendantes sont la saison (effet fixe dans le modèle) et les exploitations (effet aléatoire dans le modèle). Les mesures répétées (3 analyses par saison) nous permettent d'estimer l'effet aléatoire en utilisant l'option « répétition » de la procédure « mixed » de SAS.

La part de la variance entre exploitations par rapport à la variance totale de l'effet aléatoire « exploitation » (somme des variances entre exploitation et au sein d'une même exploitation) est estimée par le coefficient ρ .

Cette analyse de variance a été réalisée pour chacune des saisons étudiées.

5.2. Effet des conditions d'élevage sur les profils microbiens des laits

Le traitement détaillé est décrit dans la publication de la partie III du document de thèse.

Un des objectifs de la thèse est d'évaluer si les équilibres des grands groupes microbiens des laits dépendent en partie des conditions d'élevage. Par équilibre, on entend les différences de niveaux entre les grands groupes microbiens, en particulier ceux des microflore dites d'intérêt technologique et celles dites d'altération ou potentiellement pathogènes. L'objectif est d'identifier des pratiques favorisant les microflore intéressantes

dans les process fromagers comme les bactéries lactiques ou les microflores d'affinage telles les bactéries corynéformes.

Pour cela, des classes de lait sont constituées selon leurs profils microbiens pour chacune des saisons étudiées. Une Analyse en Composante Principale (ACP), et une classification ascendante hiérarchique des différentes valeurs des axes de l'ACP en utilisant la méthode d'agrégations de Ward, ont alors été réalisées.

Les groupes microbiens utilisés pour ce traitement sont détectés dans au moins 40% des échantillons de lait. Les autres groupes microbiens sont introduits comme variables supplémentaires.

Afin d'associer les conditions d'élevage aux classes de profils microbiens ainsi constituées, il est nécessaire d'associer une seule classe à l'élevage. Pour chacune des saisons étudiées, trois échantillons de laits sont analysés. Les laits peuvent donc appartenir à trois classes de profils microbiens différents. A chaque élevage, est donc associé la classe du profil microbien dominant (la même classe pour au moins 2 laits sur 3).

L'analyse des relations entre conditions d'élevage et classe de profils microbiens a été effectuée en utilisant la segmentation par arbre de décision binaire (XLStat 2008, France) en utilisant la méthode CHAID (Kass, 1980). L'intérêt de cette méthode est de hiérarchiser les conditions d'élevage qui discriminent les classes de profils microbiens et de décrire un ensemble de pratiques associées à une classe de profils microbiens.

5.3. Effet des conditions d'élevage sur les espèces bactériennes majoritaires des laits

Cet effet a été mesuré pour une seule saison, le printemps 2006.

Le traitement détaillé est décrit dans la publication du chapitre IV du document.

Les profils TTGE et DGGE des laits ont été analysés de la manière suivante : l'ensemble des bandes apparaissant sur les gels d'électrophorèse a été répertorié et noté « 1 » (présence d'espèce) si présence d'une bande ou « 0 » si absence d'une bande (pas de détection d'espèce).

Afin d'étudier les relations entre conditions d'élevage et espèces bactériennes majoritaires des laits, deux approches ont été utilisées.

La première consiste à prendre les espèces détectées individuellement et analyser les relations entre conditions d'élevage et les espèces prises une par une.

Cette approche permet d'estimer la probabilité de présence des espèces bactériennes en fonction des conditions d'élevage. Pour cela, l'on utilise un modèle logistique mixte (GLIMMIX procédure, SAS 9.1) ajusté de l'effet élevage.

La régression logistique est une technique statistique qui a pour objectif, à partir d'un fichier d'observations, de construire un modèle permettant de prédire les valeurs prises par une variable catégorielle à partir d'une série de variables explicatives continues et/ou binaires. Dans notre cas, la variable catégorielle est l'espèce microbienne selon deux modalités : absence de détection ou détection. La variable explicative (les conditions d'élevage) est binaire.

L'effet des conditions d'élevage sur la présence des espèces bactériennes est estimé par leur Odd-ratio. L'Odd ratio est le rapport de la probabilité d'occurrence d'un évènement (ici la détection d'une espèce) sur la probabilité de non occurrence. La variance entre élevage par rapport à la variance totale des effets aléatoires (somme des variances entre élevages et variance au sein d'un même élevage) est estimée par le coefficient ρ (%). Ce descripteur permet d'apprécier la part de variabilité entre les élevages de la détection d'une espèce microbienne et, par différence, la part de variabilité de la détection d'une espèce microbienne au sein d'un même élevage. Lorsque la variabilité au sein d'un élevage est importante, l'effet du facteur étudié est minoré.

La deuxième approche consiste à réaliser des classes de lait en prenant l'ensemble des espèces. Cette mise en classe a été réalisée à partir d'une Analyse en Composante Principale (ACP), et une classification ascendante hiérarchique des différentes valeurs des axes de l'ACP en utilisant la méthode d'agrégations de Ward.

L'intérêt de cette deuxième approche est de prendre en compte l'ensemble des espèces détectées pour chacun des laits et d'avoir ainsi un profil global des espèces majoritaires afin de prendre en compte les équilibres microbiens. Les conditions d'élevage discriminantes des classes d'espèces bactériennes sont évaluées par le test du Khi^2 .

Le principal inconvénient est la nécessité de réaliser des classes de profils d'espèces bactériennes par élevage afin de les associer aux conditions d'élevage. La méthode de mise en classe des laits selon leur profil d'espèces bactériennes (réalisation d'une Analyse en Composante Principale puis Classification Ascendante Hiérarchique sur les valeurs des axes de l'ACP) réduit en partie l'information, car les classes ne fixent qu'une partie de la variabilité totale des espèces bactériennes des laits. D'autre part, afin de mettre en relation

classes d'espèces et conditions d'élevage, il est nécessaire d'affecter les élevages à la classe majoritaire des laits (2 à 3 laits doivent être dans la même classe).

De ce fait, une partie des observations n'est pas prise en compte. Il est donc nécessaire de combiner les deux approches.

5.4. Effet des conditions d'élevage sur les espèces majoritaires de bactéries lactiques mésophiles

Suite aux caractérisations phénotypiques et génotypiques des isolats décrites dans la publication de la partie V de ce document, le pourcentage de souches assignées aux genres et espèces de bactéries lactiques détectées est calculé pour chaque élevage. Ceci permet de réaliser des classes de profils d'espèces ou genres bactériens pour chacun des élevages. Les relations entre conditions d'élevage et classes d'espèces ont été évaluées par des tests de χ^2 (SPAD version 5.5, Pantin, France).

CHAPITRE III
VARIABILITÉ DES GROUPES MICROBIENS
DES LAITS DANS LES ÉLEVAGES ET IMPACT
DE LA SAISON ET DES CONDITIONS
D'ÉLEVAGE

1 - INTRODUCTION

Depuis une vingtaine d'année, les niveaux de flores bactériennes dans le lait diminuent. Cet appauvrissement peut conduire à une perte de spécificité sensorielle des fromages au lait cru et de fait à une moindre différenciation par rapport aux fromages aux laits pasteurisés. Le rôle de ces microflore dans les caractéristiques sensorielles des fromages a été démontré dans de nombreuses études (Beuvier *et al.*, 1997 ; Bouton et Grappin, 1995 ; Buchin *et al.*, 1998 ; Verdier *et al.*, 2002). L'effet inhibiteur vis-à-vis des microorganismes pathogènes (El-Gazzar et Marth, 1992 ; Gay et Amgar, 2005) renforce l'intérêt du maintien de ces microflore dans les laits. Quelques études menées sur des laits de vache (Michel *et al.*, 2005, Verdier-Metz *et al.*, 2009) ont montré que les équilibres microbiens des laits crus de vache diffèrent selon les exploitations, les conditions d'élevage et de production. Ces auteurs soulignent qu'il est possible d'obtenir des laits non dépourvus de microflore et cependant de bonne qualité sanitaire. Les quelques études menées sur des laits de chèvre portent essentiellement sur la description de microflore dans un nombre restreint d'exploitations, le lien entre conditions de production et flore microbienne des laits est rarement évoqué (Alonso-Calleja *et al.*, 2002., Foschino *et al.*, 2002., Callon *et al.*, 2007). Les expérimentations entreprises dans le cadre de ce travail visent donc à caractériser les grands groupes microbiens des laits (nature et quantité de microorganismes) et ceci dans deux régions fromagères (AOP Rocamadour et AOP Pélardon). Des profils microbiens de flores sont établis. Ces profils permettent d'apprécier les équilibres microbiens et en particulier les équilibres entre les microflore d'intérêt technologique, les microflore d'altérations ou potentiellement pathogènes. Afin d'analyser les liens entre les conditions d'élevages et les profils microbiens, des enquêtes et observations dont l'objet était d'identifier les conditions d'élevage pouvant avoir un impact sur les flores microbiennes des laits ont été réalisées dans 38 exploitations. Une première publication scientifique fait état de ce travail :

H.Tormo, C.Agabriel, C.Lopez, D. Ali Haimoud Lekhal, C.Roques

“Relationship Between The Production Conditions of Goat’s Milk And The Microbial Profiles Of Milk”

International Journal of Dairy Science (Acceptée pour publication)

2 - PUBLICATION

“Relationship Between The Production Conditions of Goat’s Milk And The Microbial Profiles Of Milk”

H.Tormo ^a, C.Agabriel ^{b,c}, C.Lopez ^d, D. Ali Haimoud Lekhal ^a, C.Roques ^e

a Université de Toulouse ; Ecole d'Ingénieurs de Purpan ; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France, b Clermont Université, VetAgro Sup, UR EPR 2008.03.102, F-63012 Clermont-Fd Cedex 1, c INRA, USC 2005, F-63370, d Institut de l'Élevage, 149 rue de Bercy- 75595 Paris Cedex 12, France , e Université de Toulouse ; UPS ; LU 49, Adhésion bactérienne et formation de biofilms ; 35 chemin des maraîchers, F-31 062 Toulouse cedex 9, France

* Corresponding author : Tormo Hélène, laboratoire de microbiologie, Ecole d'Ingénieurs de Purpan, 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France Tel: +33 5 61 15 29 94; fax : +33 5 61 15 30 60. E mail adress: helene.tormo@purpan.

Keywords: milk, microorganisms, season, management practices, bedding, milking machine

ABSTRACT

The balance between microorganisms of technological interest and others in raw goat's milk have to be controlled to obtain good quality raw milk cheese. The aim of this study was: (i) to determine the microbial characteristics of goat's milk and (ii) to evaluate factors that may have a potential influence (season, management practices). Thirty eight resulting farms were selected. A survey was carried out to qualify the management practices. A total of 228 milk samples were analyzed in spring 2006 and winter 2007. Microorganisms were counted in specific culture media. Statistical analysis was done to study the links between microbial composition of milks and management practices. The average Total Bacterial Count was 3.6 log₁₀ cfu/ml. The major species were coagulase-negative staphylococci, and, to a lesser extent, mesophilic acidifying bacteria, micrococci and corynebacteriaceae. Less than 60% of the milk samples were found to contain coagulase-positive staphylococci at very low levels. The levels of the main groups of microorganisms were significantly lower in winter 2007. Microbial clusters of milk were established for the two seasons. These clusters differed in the levels of microorganisms, especially in the levels of mesophilic acidifying bacteria and micrococci and corynebacteriaceae. The relationship between management practices and microbial clusters of milk have underlined the importance of mixed practices depending on the season. The nature of the bedding and the temperature of the milking machine cleaning are the two mains factors closely linked to the microbial profile of milks. Our results underlined that it may be possible with a judicious choice of practices to increase the levels of mesophilic acidifying bacteria and micrococci and corynebacteriaceae, bacteria of technological relevance for the cheese making process, without altering the levels of undesirable bacteria (*Pseudomonas* spp., coagulase-positive staphylococci).

INTRODUCTION

The microbial characteristics of milk are particularly important for controlling the hygienic and sensorial properties of raw milk cheese, as demonstrated by several studies (Demarigny et al., 1997, Buchin and Beuvier, 2000, Verdier-Metz et al., 2005). For traditional raw milk cheeses, especially lactic acid goat's cheese, raw milk is a source of Lactic Acid Bacteria (LAB) in the whey. This whey, removed once the milk has coagulated, is used as a lactic starter (Tormo and Talliez, 2000). Other microorganisms of milk, such as yeasts or micrococci, also play a role in the ripening of soft cheese (Bhowmik and Marth, 1990, Bockelmann and Hoppe-Seyler, 2001). Nowadays, the sanitary quality of milk has been improved in France. But cheese farmers and scientists are beginning to wonder about the effect of the decrease in micro organisms of technological interest (Montel et al., 2003, Michel et al., 2005). Some studies on cow's milk have highlighted the relationships between the practices of cow's milk production and the levels of microorganisms or the balance between undesirable microorganisms and those of technological interest (Bouton et al., 2005, Michel et al., 2005). These practices concern the use of hay for food and bedding, the proximity between the forage and the cow shed, and the cleaning practices used for the teats, the milking machine and the milking parlour. The few studies on goat's milk or goat's milk cheese have described groups of microorganisms for a small number of farms (Alonso-Calleja et al., 2002, Foschino et al., 2002, Callon et al., 2007). In addition, the management practices from the bedding to the milk production were not taken into account to explain the variability in the levels of microorganisms and especially, for different regions. The aim of our study is: (i) to investigate the variability in the microbial characteristics of goats' milk used for cheese manufacturing, sampled from 38 farms in two different regions: Protected Designation of Origin (PDO) Rocamadour and PDO Pelardon cheeses ; (ii) and then, to evaluate factors that have a potential influence: season, management practices such as bedding, milking conditions, cleaning and the maintenance of the milking machine and herd management.

MATERIAL AND METHODS

Study description

The present work was conducted in spring 2006 and winter 2007, in the Languedoc Roussillon and Midi - Pyrenees regions among producers of PDO farmhouse Pelardon (18 farms) and Rocamadour cheeses (20 farms), respectively. This study was carried out under real herd management conditions. For the study of breeding and milking production practices, the farms were selected by the Rocamadour and Pelardon cheese producers' trade unions. In order to have a wide variety of abiotic factors, two monitoring seasons were chosen:

Spring: May - June 2006, labelled "spring", as most flocks were outside in pasture (26 farms out of 38). The daily temperature was between 18 and 25°C, the lactation stage between 3 and 5 months for 70 % or more of the goats in each flock. These factors could have an impact on the development and the nature of the microorganisms in the different environments (bedding, teats, milking machine, air around the bedding and milking parlour).

End of winter: February - March 2007 labelled "winter". All the flocks were housed, the daily temperature was between 10°C and 18°C and the lactation stage inferior to one month for 70 % or more of the goats in each flock.

Data collection

For each farm, a survey was carried out for each sampling season.

Some observations and measurements were included to qualify the management practices or the different environments. The observations and measurements were carried out by the investigators. Variables were categorized in seven families: (1) general characteristics of the farm (2) bedding management practices (3) environmental conditions during and after milking (4) cleaning practices and cleanness of the milking machine (5) milking machine maintenance and characteristics (6) quality and cleaning of the teat (7) cleaning practices of the dairy and milk tank. The different variables are described in table 1. Some explanatory variables concerning (i) the cleanness of the milking machine (ii) the bedding change (iii) the air entering the milking machine during milking, were reduced or transformed. The cleanness of 12 parts of the milking machine was recorded. When 2 or more parts were dirty, the cleanness of the milking machine was then noted as 'not clean'.

In other cases, the milking machine was 'clean'. The designation of the bedding change is the combination of the density and frequency of the bedding change (table 1). The designation of the air entering the milking machine during milking is the combination between the number of units and the duration of the milking (table 1).

Management practices were similar for each season. The results for the two seasons are presented in table 1.

Sample collection

For each season, three milk samples were collected: on days 1, 4 and 8. The samples were collected in the tank from each farm from the evening milking. They were immediately cooled to 10°C and stored at -25°C for 15 days.

Counts on media and collection of isolates

The main groups of microorganisms which play a role in the sensorial and hygienic quality of milk were counted on culture media. Eleven media were selected (table 2). A total of 114 samples (3 samples x 38 farms) per season were inoculated onto each medium.

Each media was inoculated with 1 ml of pure or diluted sample (1/10 to 1/10⁴). Buffered peptone water (Biomérieux, France) was used for the dilutions. For the numeration of *Pseudomonas*, yeasts and moulds, the samples were inoculated on the surface of the media. For the other microorganisms, the inoculation was carried out in the mass. The detection limit was set at 1cfu/ml for inoculation of samples carried out in the mass. For microorganism inoculated on the surface of the media, the detection limit was set at 10 cfu/ml.

Strain identification

We identified groups of bacteria or species using relatively unselective media (Blood sheep agar, Elliker modified by Chamba et al (1981), De Man Rogosa Sharpe +0.1% of vancomycin). A maximum of ten colonies with different morphotypes for each medium were selected.

- Coagulase-Negative Staphylococci (CNS, cultivated on blood sheep agar): after purification on Man Rogosa Sharpe agar, 100 strains were characterized using API

staph (Biomerieux, France) after controlling morphology, Gram staining and catalase activity.

- Mesophilic Acidifying Bacteria (MAB, cultivated on Elliker agar): after development over night , 177 strains were characterized. Phenotypic tests (Gram, catalase, salt resistance, sugar fermentation) were performed and the strains with *Lactococcus lactis* or enterococci phenotypic profiles were selected. Strains were incubated at 30°C for 24h in MRS broth and total DNA was extracted by using the Nucleospin tissue kit (Macherey Nagel, 67 722 Hoerd, France) The strains were confirmed to belong to *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris*, Enterococci by means of PCR-based method. *Lactococcus actis* subsp *lactis* or subsp *cremoris* were identified using primers His 1 and His 2 (Corroler et al., 1998). Enterococcal DNA were amplified using primers Conrev 23 and Genter according to Frahm et al. (1998). In all cases, amplification reactions were performed in a final volume of 12 µl contained 1X reaction PCR buffer (Qiagen, France), 0,3µM of each opposing primers, 2,5 mM of MgCl₂, 0,2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 0,5 U Taq polymerase and 5µL of DNA. The primer sequences and the PCR amplification conditions applied are recapitulated on table 3. Amplifications were performed with a Thermal cycler (Biorad, 92430 Marne-la-coquette, France). PCR products were electrophoresed in a 8g L-1 agarose gel (Sigma) in TBE at 100V for 3h. The 123-pb DNA ladder (Invitrogen, 95613 Cergy Pontoise, France) was used as a size standard. The DNA fragments were stained with ethidium bromide (sigma), viewed under UV light (302nm) and photographed on a digital camera (G.Box, Syngene, UK).
- *Leuconostoc* spp. These species have been cultivated in MRS (De Man Rogosa Sharpe) agar with 0.1% of vancomycin). After purification overnight, 100 strains were identified using phenotypic tests. A lactate test was carried out on Gram positive, catalase negative rod strains using an enzymatic activity kit (Biosentec, France).

Data analysis

The number of microorganisms was expressed in log 10 cfu/ml of milk.

Microbial characteristics of milk samples and variability for the two seasons

The description of the microbial characteristics of the milk samples was accomplished using descriptors for each group of microorganisms: mean, standard deviation, percentage of milk samples in which none of the different groups of microorganisms were detected

(SAS 9.1, USA). Those variables were calculated for the 114 milk samples from each season.

The relationships between the microbial characteristics of the milk samples from 38 farms and the two seasons, were analyzed using an ANOVA mixed model (SAS 9.1, USA). The dependent variables were the levels of different microorganisms in the milk samples, the independent variables were the seasons (fixed effect in the model) and the farms (random effect in the model). The repeated measurements during the two seasons allowed us to estimate the random farm effect by means of a repeated option in a mixed SAS procedure. The variance between farms with regard to the total variance of the random effects (variances between farm and variance within the same farm) was estimated by the coefficient of correlation ρ . If the variance within a farm is high, the effect of the studied factor (season) is minimized.

Microbial clusters of milk

Principle Components Analysis was carried out on the Microbial Clusters of Milk for each season. The milk samples represented in the principal components were then classified by ascending hierarchical clustering using Ward's method (minimization of intra-class variance). SPAD software version 5.5 (France) was used for this data analysis. The Total Bacteria Counts (TBC) was not included in the treatment. The groups of microorganisms taken into account in the treatment were detected in more than 40% of the milk samples. For spring, it concerned : MAB, *Enterococcus* spp., *Leuconostoc* spp., facultatively heterofermentative lactobacilli (Lb II), micrococci and corynebacteriaceae (MCY), yeasts, moulds, coliforms, Coagulase Negative Staphylococci (CNS), Coagulase Positive Staphylococci (CPS), *Pseudomonas* spp. and for winter it concerned : MAB, *Enterococcus* spp., *Leuconostoc* spp., LbII, MCY, CNS.

The others (including TBC) were considered as supplementary variables. This treatment allows us to study the relationships between microbial clusters and management practices.

Relationship between management practices and microbial clusters of milk for each season

To associate management practices with microbial clusters of milk, each farm had to be associated with one microbial cluster. There were three milk analyses per farm per season.

These milks could belong to different microbial clusters of milk. So, the dominant cluster of the three (the same cluster for 2 or 3 analyses) was considered as representative of the farm. If for some farms, there were three different microbial clusters, these farms were not taken into account in the analysis.

For each season, the relationships between the microbial cluster and the management practices were derived by means of a Classification Tree (XLStat 2008, France) using the CHAID method (Kass, 1980). The interest of this method was to organize the management practices into a hierarchy and then, to make combination of practices associated to microbial cluster. The farms described in the microbial clusters are successively split into sub groups discriminated on the variables of management practices. The segmentation is made by means of the Khi ² tests. The method takes a progressive approach as far as the cut in 2 sub groups is made on the most discriminating explanatory variable. Subdivision stops when the degrees of meaning in the Khi ² tests are superior to a threshold fixed at 5 %. This classification tree was performed for each season.

For farms with the same tendency of microbial profile for both seasons, the relationships between management practices and the microbial composition of the milk was assessed using discriminatory factor analysis (XLStat 2008, France).

RESULTS

Microbial characteristics of milk samples

We confirmed that grey convex colonies growing on blood agar medium were Coagulase-Negative Staphylococci (CNS): 89 isolates out of 100 tested were CNS.

The dominant group of microorganisms growing on Elliker modified medium was Lactic Acid Bacteria (173 colonies out of 177), with mainly *L.lactis* lactis and enterococci (161 out of 173 colonies). The *L.lactis cremoris* subspecies seems to be specific to two farms only.

The main colonies growing on MRS agar (80%) possessed the *Leuconostoc* species phenotype (cocci, Gram +, catalase -, production of D lactate).

The microbial characteristics of the milk samples for the two seasons are illustrated in table 4. Despite strong differences between the two seasons, the dominant and subdominant groups of micro-organism were the same. First, CNS (3,4 log (cfu)/ml in spring, 3,16 log

(cfu) /ml in winter) were detected in the majority of samples (99% of samples for spring and 87% of samples for winter). Second, MAB and MCY were detected with high difference of level and percentage of detection according to the season. The levels of these two groups were about five to one hundred times lower than that of the CNS (spring vs. winter). The hierarchy of levels for lactic acid bacteria (subdominant group), was the same for the two seasons. In decreasing order : *Leuconostocs* spp., *Enterococcus* spp. and Lb II. *Lactococcus lactis* was not able to be counted because there was no specific medium. Nevertheless, this species was dominant in some farms. For the other microorganisms (CPS, yeasts and moulds) the level was very low, especially in winter (less than 10 cfu /ml). The level of coliforms was depended strongly on the season. In spring, the level was almost equal to lactic acid bacteria. In winter, coliforms were not detected in 87% of milks. The ANOVA analysis (table 4) showed that the levels of each group of microorganisms were significantly lower (three to ten times lower for the main groups and one hundred times lower for coliforms, in cfu/ml) for winter than for spring (p-value less than or equal to 0.01) except for CNS,. This result was mainly due to the high percentage of groups of microorganisms in the milk samples that were not detected during the winter (table 4). Despite a season effect, the variability into farms was very high (coefficients of correlation were very low).

Relationship between management practices and microbial clusters of milk for the seasons

Microbial clusters of milk

For spring, the typology analysis highlighted 4 Microbial clusters of milk. This classification explained 64 % of the total variability in the microorganisms. The results of the typology are illustrated in table 5. The levels of the two microbial clusters A and D were completely opposed as far as the main groups of microorganisms and in particular MAB, *Enterococcus* spp, *Leuconostoc* spp, LbII, MCY, yeasts and coliforms were concerned. The cluster D was an interesting cluster for cheese making because the balance and the level of microorganisms were in favour of microbial group of technology relevance (LAB, MCY, CNS). However, coliforms were detected with a level appreciably equal to MAB.

The levels of the main groups of microorganisms in the microbial cluster of milk labelled C were slightly lower than the mean level of all the samples (MAB, *Enterococcus* spp. CNS, CPS and coliforms) except for LbII which was higher.

The microbial cluster B was not different than all the samples, except for CPS which were ten times higher.

For winter, the typology analysis highlighted 4 microbial clusters of milks. This classification explained 50 % of the total inertia. The result of the microbial clusters of milks is illustrated in table 6. Yeasts and moulds, coliforms, *Pseudomonas* spp., CPS have not been mentioned in the table 6 because the percentage of detection was very low (6% to 34%) and there was no significant of level for this .The microbial clusters of milks E and F had the lowest levels as far as the main groups of microorganisms were concerned (ten-fold lower than the mean level of all the samples) excepted for CNS (no difference with the total sample for E and significantly lower for F). The microbial clusters of milks G and H had the highest levels of the majority of the microorganisms taken into account in the construction of the classification. The level of enterococci was 60 fold higher for H than for G. Those two microbial clusters could be considered rather as microbial profile of technological relevance for cheese making because the level of lactic acid bacteria (*Leuconostocs* spp, Lb II) and MCY was higher than the microbial clusters E and F.

Relationship between management practices and the microbial clusters of milk

For spring, the three milk samples of three farms were classified in 3 different microbial clusters. These farms could not be analyzed, so 35 of the 38 farms were used for the analysis.

The Classification Tree has underlined some significant links between microbial clusters of milks and management practices. The microbial clusters of milks A, the least charged in microorganisms, was associated with 2 types of management practices (table 7). The first type concerned farms using straw and hay for bedding with regular changes of bedding and a dry method of cleaning the milking platform. The second management practice included farms using only straw for bedding with no additives, a final milking machine cleaning temperature higher than 40°C and a clean milking parlour. Therefore, this microbial cluster was associated with management practices which reduce the levels of microorganisms. In contrast, the cluster D, the most charged in microorganisms concerned farms using straw

and hay for bedding and changing the bedding less frequently than the cluster "A". For the other clusters, no major profile of practices was registered.

For the winter, 31 of the 38 farms were used for the analysis. Five farms were not analyzed because the three milks were classified in 3 different microbial clusters and 2 farms were not analyzed as they were the only two that belonged to the microbial clusters of milks "F". Consequently, this microbial cluster was removed from the analysis.

For eight farms on the fifteen in the "E" cluster (the least charged in microorganisms) the final milking machine cleaning temperature was higher than 40°C and they stopped the milk production in December and January (table 8). For those farms, the final temperature higher was significantly associated with an initial milking machine cleaning temperature higher than 55°C and a daily change of the acid and alkaline milking machine cleaning product (Pearson's chi-square test, p-value<0.05).

In contrast, for the microbial cluster "H" (the most charged in microorganism), all the farms had a final temperature equal to or less than 40°C (table 8). Those farms were significantly associated with an initial milking machine cleaning temperature below or equal to 55°C and changing the acid and alkaline milking machine cleaning product less than daily (Pearson's chi-square, p-value<0.05).

For the cluster "G", no major profile of practices was registered.

Relationship between the management practices and the microbial clusters of milks including the two seasons

Eleven of the 38 farms had similar microbial clusters of milk for the two seasons. Five farms had the lowest levels of the main groups of microorganisms and the three samples from each season were in the microbial cluster the least charged in microorganisms. Six farms had the highest levels of the main groups of microorganisms (labelled "F+" for the two seasons) and were in clusters the most charged in microorganisms in spring (cluster D) and in winter (cluster H) .

The discriminatory factor analysis showed the significant effect of the management practices for the two groups of farms (table 9), which concerned: the nature of the bedding and the initial and final temperatures of milking machine cleaning. The practices linked to the microbial clusters of milks "F-" tended to limit the microorganisms in the environment. In contrast, the practices linked to the microbial clusters of milks "F+" tended to increase the microorganisms in the environment.

DISCUSSION

The low TBC levels found in this study are similar to those found in studies on cow's milk (Michel et al., 2001, Bouton et al., 2005., Ercolini et al., 2009). The dominance of CNS in goat's milk confirms previous findings (Valle et al., 1991, Kyozaire et al., 2005). The other major groups include bacteria of technological cheese relevance: MAB (mainly represented by the lactic acid bacteria) and MCY (cheese ripening bacteria). *L.lactis*, *Leuconostoc* spp. and *Enterococcus* spp., are the major lactic acid bacteria found, as underlined in a study on cow's milk by Zamfir et al. (2006) and on goat's milk by Badis et al. (2004b). Concerning MCY, some studies reported their sub-dominance in goat milk (Tornadijo et al., 1996, Garcia et al., 2009, Callon et al., 2007). The other groups of microorganisms (yeasts, moulds, *Pseudomonas* spp., CPS) were found in milk in very low levels (75% of milk samples < 100 cfu/ml) as were the levels in cow's milk (Bouton et al., 2005, Raynaud et al., 2005, Michel et al., 2005). The number of coliforms strongly depended on the season. In spring, the levels were approximately equal to those of MAB and MCY; in winter the counts were one hundred times lower and they were only detected in 13% of the milk samples. Except for CNS, the numbers decreased in winter, which is similar to the trends in cow's milk (Bouton et al., 2005., Raynaud et al., 2005, Michel et al., 2005) and in milk from small ruminants in the Mediterranean area (Kalogridou-Vassiliadou et al., 1991, Salmeron et al., 2002). Yeasts and moulds were commonly found during the spring in low levels in comparison with the other microflora. These levels are similar to those found in cow's milk (Michel et al., 2001, Bouton et al., 2005). During the winter, only 20 to 30% of the milk samples contained yeasts and moulds. As far as we know, this variability of the presence of yeasts and moulds due to the season has never been reported in goat milk. The detection of *Pseudomonas* spp. in milk was also strongly affected by the season. The main factor which could explain this microbial variability is probably the fact that it is colder in winter. The temperature may reduce the capacity of environmental microorganisms to multiply. In addition, the lactation stage may affect the microbial composition of milk. Some studies show the incidence of lactation on microorganisms involved in ruminant mastitis (Bergonnier et al., 2003), but no data have been published for other microorganisms.

The analysis of the relationships between management practices and microbial clusters of milk has highlighted the effect of mixed practices on microorganisms. These practices

depended on the season, but the trend was the same: there is a total contrast between the practices associated with milk samples containing low levels of microorganisms and milk samples containing high levels. Generally, practices that limit the level of microorganisms in the environment (bedding, milking machine) were associated with low levels of microorganisms in the milk samples, especially Lactic Acid Bacteria. In addition, the analysis of the relationships between management practices and microbial clusters of milk for farms with the same microbial profile for the seasons has highlighted the major effect of the nature of the bedding and the initial temperature of the milking machine cleaning. The level of the main groups of microorganisms in the milk sample was higher when the bedding was made from straw and hay rather than only straw. Our results show that for the same nature of bedding, the level of microorganisms for spring is linked to the change of bedding or the final cleaning temperature. Concerning the bedding, our results support those of Sevi *et al.* (2003a) and Albenzio *et al.* (2005), who showed that the maintenance of the bedding was important for the level of the microorganisms of cow's milk. Furthermore, our study underlined that the nature of the bedding could have an impact on the microbial composition of milk. The milking machine cleaning temperature is highlighted for the two seasons. *Enterococcus* seems to be selected when the final milking machine cleaning temperature is lower than 40°C for winter. The effect of the cleaning conditions of the milking machine, often associated with global hygienic condition on the level of microorganisms was underlined for some studies in cow's milk (Chatelin and Richard, 1981, Michel *et al.*, 2001). In addition, Kakgli *et al.* (2007) found that the major clones of lactobacilli and enterococci isolated in a farm dairy environment come from the milking machine and the bulk-tank. So we may suppose that, when the temperature of the milking machine cleaning is lower, these bacteria could be improved, as it was shown in our study, especially for enterococci. In addition, farmers which stop goat lactation in winter and apply practices which decrease levels of microorganisms (final milking machine cleaning temperature higher than 40°C) have milk samples with very low levels of microorganisms. This result is probably due to the combination of the effects of the season (low temperature), the cleaning practices and the probable reduction of microorganisms in the milking machine during the drying off period for the goats. This report could explain the difficulty underlined by the farmer in making cheese in the beginning of the lactation. No studies have reported this result to our knowledge.

CONCLUSION

The results indicate that there is a great variability in microbial composition of raw goat's milk except for CNS, which dominate. However, the microflora of technological interest in the cheese making process (Lactic acid bacteria and MCY) was detected as dominant in some milk samples. The low levels of CPS and *Pseudomonas* spp. (less than 200 cfu/ ml) was proof of the good hygienic quality of the analysed milk samples. The variability in microbial composition was associated with (i) the season (ii) management practices and (iii) the interaction between season and management practices. These very low levels during the winter, especially for the farms that stop lactation, may explain the difficulties observed in making cheese at the beginning of the lactation season. The relationships between management practices and microbial clusters of milks have underlined the importance of mixed practices, including the nature of bedding, the cleanness and cleaning of the milking parlour and the milking machine. In addition, for farms which stop milk production, the absence of contact of the milk in the milking machine might reduce the level of microorganisms during the beginning of the lactation, especially lactic acid bacteria. For the first time in France, this study has highlighted the microbial composition in goat's milk from a high number of farms in two different regions and the relationships between the microbial profile and management practice itineraries using classification trees. The levels of LAB and in a lesser measure, MCY, may be increased by practices which transfer microorganisms from bedding to the milking machine. The above-mentioned practices seem to increase the levels of 'ambiguous' enterococci in milk and coliforms for the spring season. So, it is necessary to more specify the environment and practices that favour microorganisms of interest in cheese technology such as *L. lactis* for example. Then, the relationship between these practices, the microbial profile of milk, and the hygienic and sensorial quality of cheese could be investigated.

This study was supported by the Midi-Pyrénées Conseil Régional and the association GALA (Janzé, France).

Acknowledgements: The authors would like to thank the technicians and farmers from the Pelardon and Rocamadour regions for their implication in this study and Agnès Delacroix Buchet for her help in the writing of this paper.

Références

- Abd-El-Malek, Y. and T. Gibson, 1952. Studies in the bacteriology of milk. III. The corynebacteria of milk. J. Dairy Res., 19 : 153-159.
- Alonso-Calleja, C., J. Carballo, R. Capita, A. Bernardo and M.L. Garcia-Lopez, 2002. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. Letters in Applied Microbiology, 34 : 134-138.
- Badis, A., D. Guetarni, B. Moussa-Boudjema, D.E. Henni and M. Kihal, 2004a. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. Food Microbiology, 21 : 579-588.
- Badis, A., D. Guetarni, B. Moussa-Boudjema, D.E. Henni, M.E. Tornadijo and M. Kihal, 2004b. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. Food Microbiology, 21 : 343-349.
- Bergere, J.L. and C. Tourneur, 1992. The Bacteries of Surface of Cheeses. The Microbial Groups of Dairy Interest, Hermier, J., J. Lenoir and F. Weber, (Eds.). CEPIL, Paris, pp: 127-163.
- Bergonier, D., R. de Cremoux, R. Rupp, G. Lagriffoul and X. Berthelot, 2003. Mastitis of dairy small ruminants. Vet. Res, 34 : 689-716.
- Beuvier, E., K. Berthaud, S. Cegarra, A. Dasen, S. Pochet, S. Olang Buchin and G. Duboz., 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. International Dairy Journal, 7 : 311-323.
- Bouton, Y. and R. Grappin, 1995. Comparison of the final quality of a swiss-type cheese made from raw or microfiltered milk. Lait, 75: 31-44.

- Bouton, Y., L. Tessier, T.P. Guyot and E. Beuvier, 2005. Relationships between dairy farmer practices and the level of microbiological population in milk used for Comté cheese making). Proc. 12th Rencontres Recherche Ruminants Conf., 403-403.
- Buchin, S., V. Delague, G. Duboz, J.L. Berdague, E. Beuvier, S. Pochet and R. Grappin, 1998. Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of a semi-hard cheese. J. Dairy Sci., 81 : 3097-3108.
- Callon, C., F. Duthoit, C. Delbes, M. Ferrand, Y. le Frileux, R. de Cremoux and M.C. Montel, 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. Systematic and Applied Microbiology, 30 : 547-560.
- Caridi, A., Micari, P., Caparra, P., Cufari, A., Sarullo, V., 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. International Dairy Journal 13, 191-200.
- Casalta, E., Y. Vassal, M.J. Desmazeaud and F. Casabianca, 1995. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus-lactis* isolated from Corsican goat milk and cheese. Food Sci. Technol. Lebensmittel Wissenschaft Technol., 28 : 291-299.
- Coiffier, O., 1992. Coliforms Bacteria. The Microbial Groups of Dairy Interest, Hermier, J., J. Lenoir and F. Weber (Eds.).Chap., 3, CEPIL, Paris, pp: 303-323.
- Coppola, S. and D. Ercolini, 2008. Dairy Products. Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods, Cocolin, L. and D. Ercolini (Eds.). Chap. II, Springer, New York, USA., pp 31-90.
- Corroler, D., I. Mangin, N. Desmasures and M. Gueguen, 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. Appl. Environ. Microbiol., 64 : 4729-4735.
- Crombach, W.H., 1974. Relationships among coryneform bacteria from soil cheese and sea fish. Antonie Van Leeuwenhoek 40 : 347-359.

- Dalmasso, M., S. Prestoz, V. Rigobello and Y. Demarigny, 2008. Behavior of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* in a Four *Lactococcus* Strain Starter during Successive Milk Cultures. *Food Sci. Technol. Int.*, 14 : 469-477.
- Delos Reyes-Gavilan, C.G., G.K.Y. Limsowtin, P. Tailliez, L. Sechaud and J.P. Accolas, 1992. A *lactobacillus-helveticus*-specific DNA probe detects restriction-fragment-length-polymorphisms in this species. *Applied Environ. Microbiol.*, 58 : 3429-3432.
- El-Gazzar, F.E., H.F. Bohner and E.H. Marth, 1992. Antagonism between *listeria-monocytogenes* and lactococci during fermentation of products from ultrafiltered skim milk. *J. Dairy Sci.*, 75, 43-50.
- Ercolini, D., F. Russo, I. Ferrocino and F. Villani, 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 26 : 228-231.
- Facklam, R., M.G. Carvalho and L. Teixeira, 2002. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*, Gilmore, M. (Ed.). pp: 1-54. Washington, DC: ASM Press. .
- Foschino, R., A. Invernizzi, R. Barucco and K. Stradiotto, 2002. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69 : 213-225.
- Gay, M. and A. Amgar, 2005. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. *Lait*, 85 : 153-170.
- Giannino, M.L., M. Marzotto, F. Dellaglio and M. Feligini, 2009. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 130 : 188-195.
- Jayne-Williams, D.J. and T.M. Skerman, 1966. Comparative studies on coryneform bacteria from milk and dairy sources. *J. Applied Bacteriol.*, 29 : 72-92.

- Keddie, R.M., B.G.S. Leask and J.M. Grainger, 1966. A comparison of coryneform bacteria from soil and herbage: Cell wall composition and nutrition. *J. Applied Bacteriol.*, 29 : 17-43.
- Klijn, N., A.H. Weerkamp and W.M. de Vos, 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 : 788-792.
- Kyozaire, J.K., C.M. Veary, I.M. Petzer and E.F. Donkin, 2005. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. *Journal of the South African Veterinary Association-Tydskrif Van Die Suid-Afrikaanse Veterinere Vereniging*, 76 : 69-73.
- Lafarge, V., J.C. Ogier, V. Girard, V. Maladen, J.Y. Leveau, A. Gruss and A. Delacroix-Buchet, 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied Environ Microbiol.*, 70 : 5644-5650.
- Michel, V., A. Hauwuy and J.F. Chamba, 2001. Raw cowmilk microflora: diversity and influence of conditions of production. *Lait*, 81 : 575-592.
- Michel, V., A. Hauwuy, M.C. Montel, J.B. Coulon and J.F. Chamba 2005. Pratiques d'élevage et composition microbienne des laits crus (Breeding practices and microbial composition of raw milks). In: *Territoires et enjeux du développement régional*. Lyon, 9-11 Mars 2005. INRA. s.p.
- Mohan, K., 1981. *Brevibacterium* species from poultry. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 47, 449-453.
- Ogier, J.C., V. Lafarge, V. Girard, A. Rault, V. Maladen, A. Gruss, J.Y. Leveau and A. Delacroix-Buchet, 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.*, 70 : 5628-5643.

- Ogier, J.C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez and A. Delacroix-Buchet, 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied Environ. Microbiol.*, 68 : 3691-3701.
- Owens, J.D. and R.M. Keddie, 1969. The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. *J. Applied Bacteriol.*, 32 : 338-347.
- Pitcher, D.G. and W.C. Noble, 1978. Aerobic Diphtheroids of Human Skin. In: *Coryneform Bacteria*, Bousfield, I.J. and A.G. Callely (Eds.). London, Academic Press.
- Rasolofo, E.A., D. St-Gelais, G. LaPointe and D. Roy, 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology*, 138 : 108-118.
- Schefferle, H.E., 1966. Coryneform bacteria in poultry deep litter. *J. Applied Bacteriol.*, 29, 147-160.
- Todhunter, D.A., K.L. Smith and J.S. Hogan, 1991. *Serratia* species isolated from bovine intramammary infections. *J. Dairy Sci.*, 74 : 1860-1865.
- Valle, J., S. Piriz, R. De La Fuente and S. Vadillo, 1991. Staphylococci isolated from healthy goats. *Zentralbl Veterinarmed B*, 38 : 81-89.
- Verdier-Metz, I., B. Martin, P. Pradel and J.B. Coulon, 2002. Combined effect of the breed and the type of forage on the cheese characteristics: interaction with the cheese-making used. *Renc. Rech. Ruminants*, 12, 355-358.
- Verdier-Metz, I., V. Michel, C. Delbes and M.C. Montel, 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk ? *Food Microbiology* 26, 305-310.

Tables and figures

Table 1 : Groups of variables describing the management practices stable over the year and number of farms per practices

Variable Level	Level	Number of farms
General management		
Size of the flock	≤ 132 goats	24
	> 132 goats	14
Pasture in spring and summer	yes	26
	no	12
Level of production (kg/goat/year)	≤ 650kg	16
	>650kg	22
Region	DOP Rocamadour	20
	DOP Pélardon	18
Lactation	all the year	16
	stop in winter	22
Management practices of bedding		
Bedding	straw	19
	Straw + hay	19
Bedding change 2	unsufficient	5
	sufficient	17
	very sufficient	16

² Bedding change insufficient : high density (<2,5m²/goat) and low frequency of change (less than 3 times in a year). Bedding change sufficient : low density (≥ 2,5m²/goat) and low frequency of change or high density and high frequency of change (more than 3 times in a year). Bedding change very sufficient : low density and high frequency of change.

Table 1 (continued) : Groups of variables describing the management practices stable over the year and number of farms per practices

Variable Level	Level	Number of farms
Additives in the bedding	yes	10
	no	28
Environmental conditions during and after the milking		
Air entering during the milking ³	low : < 770	16
	medium [770, 1200[10
	high ≥ 1200	12
Cleanliness of the milking parlour	not clean : straw, hay and faeces	21
	Clean : no straw, hay and faeces	17
Frequency of the milking parlour cleaning	frequently : after each milking	27
	not frequently : less frequently than after each milking	11

³Air entering during the milking : number of unit* 8l/min* duration of the milking.

Table 1 (continued): Groups of variables describing the management practices stable over the year and number of farms per practices

Variable level	Level	Number of farms
Feed during the milking	no feed	11
	whole grains	19
	powder	8
Location of the milking parlour	no separation with the bedding area	14
	Physical separation	24
Cleaning and cleanliness of the milking machine		
Cleanliness of the milking machine	clean	24
	not very clean : some elements in the machine are not clean	14
Initial temperature of the milking machine cleaning	low : $T_i^4 \leq 55^\circ\text{C}$	13
	high : $T_i > 55^\circ\text{C}$	25
Final temperature of the milking machine cleaning	low : $T_f^5 \leq 40^\circ\text{C}$	20
	high : $T_f > 40^\circ\text{C}$	18

⁴ Initial temperature of the milking machine cleaning.

⁵ Final temperature of the milking machine cleaning.

Table 1 (continued): Groups of variables describing the management practices stable over the year and number of farms per practices

Variable level	Level	Number of farms
Air pipeline cleaning	very frequently : every month	12
	frequently : one to 4 times in a year	17
	unfrequently : less than one time in a year	9
Drying the pipeline of the milking machine	yes	24
	no	14
Water residue in the milking machine	yes	12
	no	26
Maintenance and characteristic of the milking machine		
Age of the milking machine	< 10 years	19
	>10 years	19

Table 1 (continued) : Groups of variables describing the management practices stable over the year and number of farms per practices

Variable level	Level	Number of farms
Number of clusters	≤ 10	19
	> 10	19
Length of the pipeline	≤ 12m	18
	> 12m	20
Number of elbow and fittings	≤ 5	27
	>5	11
Changing of the liner	frequently : every year	18
	not frequently : less frequently than every year	20
Changing of the rubber pipes	Frequently : every two years	8
	not frequently than every two years	30
Status and cleaning of teats		
Status of teats	healthy teats	29
	teats with some indurations, ganglions, abcess...	9
Disinfecting teats after milking	yes	8
	no	30

Table 1 (continued) : Groups of variables describing the management practices stable over the year and number of farms per practices

Variable level	Level	Number of farms
Cleanliness of the dairy house and cleaning of the milk tank		
Cleanliness of the dairy house	clean	26
	not clean	12
Intercleaning with alkaline and acid products	frequently : change of product once or more in a week	23
	not frequently : change less than once in a week	15

Table 2 : Characteristics of the different culture media

Technological definition of microorganisms	Name of groups of microorganisms	Culture Medium	Conditions of incubation	Colony count	Bibliographic references and suppliers
<i>Total mesophilic bacteria</i>	Total Bacteria Count (TBC)	Plate Count Agar + 0,1% of skim milk powder	30°C; 72 h	All the colonies	IDF (1991a) DIFCO, France
<i>Presumptive Lactic Acid Bacteria group</i>	Mesophilic Acidifying Bacteria (MAB)	Elliker modified by Chamba (1981)	20°C; 72 h	Yellow colonies	Chamba et al (1981) BIORAD, France
	Enterococci	Bile Esculine Azide Agar (BEA)	37°C; 48 h	Colonies with black halo	AES, France
<i>Genus or species of Lactic Acid Bacteria</i>	<i>Leuconostocs</i> spp. Facultatively heterofermentative lactobacilli (LbII)	Man Rogosa and Sharpe + 0,1% vancomycin Isolini et al. (1990) + 0,1% vancomycin	20°C; 96h 37°C; 48 h	All the colonies All the colonies	AES, France Isolini et al. (1990)

Technological definition of microorganisms	Name of groups of microorganisms	Culture Medium	Conditions of incubation	Colony count	Bibliographic references and suppliers
<i>Groups of microorganisms that are involved in cheese ripening</i>	Micrococci and corynebacteriaceae (MCY)	Cheese Ripening Bacteria medium + 0,1% furazolidone	20°C; 120h	All the colonies	Denis <i>et al.</i> (2001)
	Coagulase Negative Staphylococci (CNS)	Blood agar	37°C; 48 h	Grey and convex colonies	BIORAD, France
	Yeasts	Yeast Glucose Chloramphenicol agar (YGC)	20°C; 120 h	Colonies without convolution circles	IDF (1991) AES, France
	Moulds	Yeast Glucose Chloramphenicol agar (YGC)	20°C; 120 h	Colonies with convolution circles	IDF (1991) AES, France
<i>Potentially pathogenic microorganisms</i>	Coagulase - Positive Staphylococci (CPS)	Baid Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen	37°C; 48 h	Dark colonies with halos	Beckers et al, 1984 Biomérieux, France

Technological definition of microorganisms	Name of groups of microorganisms	Culture Medium	Conditions of incubation	Colony count	Bibliographic references and suppliers
<i>Microorganisms that could cause defects</i>	Coliforms	Violet Red Bile Lactose A	30°C; 48 h	Red colonies with diameter > 0.5 mm	IDF (1985) AES, France
	<i>Pseudomonas</i> spp.	Cetrimid agar	20°C; 120 h	All the colonies	AES, France

Table 3 : Primer sequences, amplification and application of PCR reactions

Primer sequences	Amplification conditions	Application
His1 : 5'-CTTCGTTATGATTTTACA -3' His2 : 5'- AATATCAACAATTCCATG-3'	5 min at 94°C, 30 cycles of : 1 min 94°C, 2 min at 45°C, 2 min at 72°C, final step 5 min at 72°C	Confirmation of the subspecies <i>Lactococcus</i> <i>lactis lactis</i> and <i>cremoris</i>
Conrev 23: 5'- GGTGGATGCCTTGGCACT 3' Genter : 5'-CTCTACCTCCATCATTCT-3'	5 min at 94°C, 30 cycles of : 30 sec 94°C, 30 sec at 52°C, 30 sec at 72°C, final step at 4°C	Confirmation of the genus <i>Enterococcus</i>

Table 4 : Microbial characteristics of milk samples (mean value and standard deviation were expressed in log₁₀ cfu/ml) for spring (n=114) and winter (n=114)

Label	Spring 2006		Winter 2007		ρ ³ (%)	Ratio ⁴
	Means ±σ ¹	No detection ²	Means ±σ	% of milk		
TBC	3.79± 0.58	0	3.41± 1.00	2	18	2
Presumptive LAB group						
MAB	2.60±0.88	0	1.17± 0.88	30	14	27
<i>Enterococcus</i> spp	1.71±0.80	4	0.77± 0.93	54	21	9
<i>Leuconostoc</i> spp	2.19±0.76	0	1.13± 0.96	47	31	11
Lb II	1.44±0.83	15	0.91± 0.96	56	46	0
Ripening Flora						
MCY	2.64±0.50	1	1.20± 1.43	56	12	27
Yeasts	1.41±0.88	14	0.43± 0.71	66	8	9
Moulds	0.81±0.69	27	0.26± 0.56	81	23	4
CNS	3.30± 0.62	1	3.16±1.41	13		
Undesirable' flora						
CPS	1.00±0.97	43	0.46± 0.77	72	0	3
Coliforms	2.27±0.84	4	0.23± 0.63	87	20	111
<i>Pseudomonas</i> spp	1.29±0.99	30	0.17± 0.67	94	18	13

¹σ : standard deviation; ² : percentage of milks with no detection of the different groups of microorganisms,

³ρ(%) = coefficient of correlation of the random factor effect (farms)

⁴Ratio : ratio of mean for each groups of microorganism (spring vs winter).

Table 5 : Characteristics of microbial clusters of milk samples for spring(mean value and standard deviation were expressed in log 10 cfu/ml)

	Microbial clusters of milk samples				Total sample
	A	B	C	D	
Number of milks	22	31	34	27	114
TBC	3.38± 0.29	3.67 ± 0.25	3.58 ± 0.32	4.52 ± 0.63	3.79 ± 0.58
MAB	1.76± 0.37	2.61 ± 0.47	2.24 ± 0.44	3.72 ± 0.83	2.60 ± 0.58
<i>Enterococcus</i> spp	0.98 ± 0.54	1.88 ± 0.48	1.38 ± 0.52	2.52 ± 0.76	1.71± 0.80
<i>Leuconostoc</i> spp	1.42 ± 0.50	2.01 ± 0.43	2.11 ± 0.42	3.11 ± 0.64	2.19± 0.76
LbII	0.48 ± 0.62	1.32 ± 0.59	1.75 ± 0.57	1.97 ± 0.78	1.44 ± 0.83
MCY	2.22 ± 0.67	2.63 ± 0.34	2.72 ± 0.33	2.87 ± 0.46	2.63 ± 0.50
CNS	3.09 ± 0.54	3.42 ± 0.33	2.88 ± 0.66	3.85 ± 0.41	3.30 ± 0.50
Yeasts	0.91 ± 0.90	1.27 ± 0.81	1.29 ± 0.72	2.13 ± 0.65	1.41 ± 0.88
Moulds	0.6 ± 0.54	0.93 ± 0.69	0.74 ± 0.63	0.93± 0.79	0.81 ± 0.69
CPS	1.33 ± 0.92	1.93 ± 0.58	0.19 ± 0.39	0.67 ± 0.82	1.00 ± 0.97
Coliforms	1.57 ± 0.72	2.43 ± 0.52	1.94 ± 0.61	3.09 ± 0.75	2.27 ± 0.84
<i>Pseudomonas</i> spp	1.05 ± 0.89	1.37 ± 1.01	1.15 ± 0.97	1.58 ± 0.97	1.29 ± 0.99

The numbers in bold are the values significantly different to the total sample (p value< 0.01)

Table 6 : Characteristics of microbial clusters of milk samples for winter (mean value and standard deviation were expressed in log 10 cfu/ml)

	E	F	G	H	Total sample
number of milks	34	15	32	33	114
TBC	3.25 ± 0.83	2.6 ± 0.66	3.39 ± 1.16	3.97 ± 0.75	3.41 ± 0.99
MAB	0.89 ± 0.81	0.26 ± 0.53	1.30 ± 0.63	1.72 ± 0.84	1.17 ± 0.88
<i>Enterococcus</i> spp.	0.53 ± 0.73	0.31 ± 0.53	0.09 ± 0.28	1.88 ± 0.61	0.77 ± 0.92
<i>Leuconostoc</i> spp.	0.33 ± 0.65	0.27 ± 0.57	1.68 ± 0.63	1.82 ± 0.96	1.13 ± 0.96
LbII	0.17 ± 0.47	0.19 ± 0.49	1.34 ± 0.83	1.58 ± 0.97	0.91 ± 0.97
MCY	0.15 ± 0.61	0.72 ± 1.52	2.01 ± 1.32	1.72 ± 1.33	1.20 ± 1.43
CNS	3.42 ± 0.67	0.00 ± 0.00	3.77 ± 0.63	3.75 ± 0.82	3.16 ± 1.41

The numbers in bold are the values significantly different to the total sample (p value < 0.01)

Table 7 : Number of farm for each microbial cluster associated with specific combination of management practices for spring

Combination of management practices	Microbial clusters of farms			
	A (7 ¹)	B (11)	C (10)	D (7)
Bedding with straw with no additive in the bedding and final temperature of the milking machine cleaning >40°C and milking parlour clean	3	0	0	0
Bedding with straw and hay and important change of bedding and milking parlour cleaning with dry method	4	0	0	0
Bedding with straw and hay and a low or medium frequency of change of bedding	0	0	0	7

¹The numbers in parenthesis are the total numbers of farms for each microbial cluster of farms)

Table 8: Number of farm for each microbial cluster associated with specific combination of management practices for winter

Combination of management practices	Microbial cluster of farm		
	E(15 ¹)	G(8)	H(8)
Stop of milking in winter and final temperature of the milking machine cleaning >40°C	8	1	0
Final temperature of the milking machine cleaning ≤ 40°C	4	1	8

¹ The numbers in parenthesis are the total numbers of farms for each microbial cluster of farms.

Table 9 : Percentage of farms in the two microbial cluster "F-" and "F+" associated with management practices (spring and winter seasons)

Management practices	Farms affected to Microbial clusters (%)	
	"F-" (n=5)	"F+"(n=6)
Bedding with straw	80,00%	0,00%
Bedding with straw and hay	20,00%	100,00%
Initial temperature of the MM cleaning > 55°C	100,00%	33,33%
Initial temperature of the MM cleaning ≤ 55°C	0,00%	66,67%

The numbers in bold underline the dominant practice significantly associated with microbial clusters (p value < 0,05).

CHAPITRE IV
DIVERSITÉ DES ESPÈCES BACTÉRIENNES
MAJORITAIRES DES LAITS CRUS ET
INFLUENCE DES CONDITIONS D'ÉLEVAGE

1 - INTRODUCTION

Comme nous l'avons montré dans la première partie de nos travaux, les équilibres microbiens des laits diffèrent selon les élevages. Cette différence peut être attribuée à la saison mais également à certaines conditions d'élevage, elles mêmes dépendantes de la saison. Les conditions de couchage des animaux ainsi que les conditions de nettoyage de la machine à traire sont des éléments qui influent sur les équilibres microbiens. Les niveaux de microflore (en particulier les bactéries lactiques) sont les plus élevés lorsque des refus de foin dans les litières sont ajoutés et lorsque les températures de nettoyage de la machine sont basses. Ces premiers résultats nécessitent d'être complétés par une analyse plus fine des microflore des laits. En effet, la technique de dénombrement microbien sur milieu de culture permet de quantifier des groupes microbiens mais il est difficile d'identifier des genres ou des espèces microbiennes. Or, dans un même groupe microbien, certains genres ou espèces n'ont pas le même rôle en technologie fromagère. La finalité de ce travail étant d'identifier des pratiques favorisant l'ensemencement en microflore d'intérêt technologique, il est donc nécessaire d'identifier les genres et espèces de microflore dominantes. Nous avons donc caractérisé, dans les mêmes élevages, les espèces majoritaires des laits et ceci pour des laits de printemps (2006), en utilisant des techniques de typage moléculaire « culture indépendante ». Les liens entre conditions d'élevage et espèces majoritaires ont été recherchés. Les résultats obtenus ont fait l'objet de la deuxième publication scientifique insérée dans ce document de thèse :

H. Tormo, A. Delacroix-Buchet, C. Lopez, D. Ali Haimoud Lekhal, C. Roques

**Farm management practices and diversity of the dominant bacterial species in raw
goat's milk**

International Journal of Dairy Science (acceptée pour publication).

2 - PUBLICATION

**FARM MANAGEMENT PRACTICES AND
DIVERSITY OF THE DOMINANT BACTERIAL SPECIES IN RAW
GOAT'S MILK**

H. Tormo ^a, A. Delacroix-Buchet ^b, C. Lopez ^c, D. Ali Haimoud Lekhal ^a, C. Roques ^d
^a Université de Toulouse; Ecole d'Ingénieurs de Purpan; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France,

^b INRA (UMR 1319) and AgroParisTech, Institut Micalis, F-78352 Jouy-en-Josas, France

^c Institut de l'Elevage, 149 rue de Bercy- 75595 Paris Cedex 12, France,

^d Université de Toulouse; UPS; LU 49, Adhésion bactérienne et formation de biofilms; 35 chemin des maraîchers, F-31062 Toulouse cedex 9, France

* Corresponding author: Tormo Hélène, Mailing address: laboratoire de microbiologie, Ecole d'Ingénieurs de Purpan, 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France Phone: +33 5 61 15 29 94; Fax: +33 5 61 15 30 60.

E-mail: helene.tormo@purpan.fr.

Keywords: bacterial communities, temporal temperature gradient gel electrophoresis, denaturing gradient gel electrophoresis, zero grazing, milking machine, milking parlour, herd health

.

ABSTRACT

The balance between microorganisms of technological interest and others in raw goat's milk has to be controlled to obtain good quality raw milk cheese. Studies on cow's milk have already underlined some relationships between management practices and the microbial quality of milk, but only a few have been carried out on goat's milk. The aim of this study was: (i) to determine the main bacterial species present in goat's milk and (ii) to identify management practices that may have a potential influence on the bacterial species in the milk. In order to have a wide variety of management practices, we have selected two different regions: PDO Rocamadour and PDO Pelardon cheeses.

The bacterial species present in samples of raw goat's milk from 30 farms in the regions of interest were characterized by PCR-Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (PCR-TTGE) and PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE).

The predominant bacterial species in the samples of raw goat's milk studied belonged to the genera *Staphylococcus*, *Arthrobacter* and *Serratia*. Lactic acid bacteria (*Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis*) were only detected in 25% of the milk samples. *Brevibacterium linens* was detected systematically in milk from zero-grazing herds. High standards of hygiene with regard to milking machine cleaning considerably reduced the number of dominant species in the milk; lactic acid bacteria, in particular were no longer detected. On the other hand, inferior hygiene increased the number of species present and *E. faecalis* was more commonly found. Herd health management was a determining factor in the microbial contamination of the milk samples studied. Inferior health conditions increased contamination of the milk with *Serratia* and *Staphylococcus*. Direct contact between the milking room and the goats' housing appeared to enrich the milk in *L. lactis*. Our results underlined that it may be possible to influence the balance between the bacteria present in milk using certain practices.

INTRODUCTION

The paramount role of the microflora on the sensory characteristics of cheese has been demonstrated in many studies on various cheese technologies. Suppression of the microflora in raw milk (by microfiltration or pasteurization) causes a reduction in the flavour and aromatic differences of the resulting cheese (Beuvier et al., 1997; Bouton and Grappin, 1995; Buchin et al., 1998; Verdier-Metz et al., 2002). In addition to the value that certain bacterial populations present in raw milk can provide in terms of the sensory qualities of the cheese, they have also been shown to have an inhibitory effect on pathogenic microorganisms (El-Gazzar et al., 1992; Gay and Amgar, 2005). In France, payment according to milk quality stipulates low microbial counts as a measure of milk quality, the priority being to reduce the numbers of microorganisms that cause spoilage or are potentially pathogenic. This necessary reduction in the levels of unwanted microorganisms has undoubtedly modified the composition of the bacterial flora that is useful to cheese-making technology. A few studies, most of which were on cow's milk, have shown that the balance between the spoilage or pathogenic bacterial flora and the bacterial flora of technological interest is influenced by farm management practices, particularly those concerning udder cleaning and disinfection and milking hygiene (Michel et al., 2001; Michel et al., 2005). Verdier-Metz et al. (2009) also showed that the diversity of bacterial species in raw milk declined significantly when standards of hygiene (from teat preparation to milk production) were high. Only coryneform bacteria were detected in these milk samples. This imbalance, and in particular the absence of lactic acid bacteria, can decrease the sensory diversity of the resulting cheese. Very few studies have been conducted on this subject in goats and they investigated only a small number of farms (Alonso-Calleja et al., 2002; Foschino et al., 2002; Callon et al., 2007). In addition, farm management practices, from the goats' housing to milk production, have not been evoked to explain the variability of the bacterial characteristics of milk. The recent development of DNA fingerprinting techniques has enabled the use of another approach to analyse the bacterial communities present in a medium (Coppola and Ercolini, 2008). These methods are based on DNA extraction without prior microbial culture. This gives a comprehensive snapshot of the dominant bacterial communities present, without previously selecting certain microbial groups at the expense of others, as occurs in culture-dependent techniques. These culture-independent molecular techniques have been applied to the

assessment of microbial diversity in milk. This is the case in Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) (Callon et al., 2007; Verdier-Metz et al., 2009), Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) techniques (Ogier et al., 2002; Ogier et al., 2004; Lafarge et al., 2004 ; Ercolini et al., 2009 ; Giannino et al., 2009). The objectives of this study were to elucidate the profiles of the dominant bacterial communities in raw goat's milk samples and the relationships between these bacterial communities and farm management practices (from goat housing to milk production). This study was carried out under real herd management conditions among 30 farmers of PDO (Protected Designation of Origin) farmhouse Pelardon and Rocamadour cheeses respectively. TTGE and DGGE techniques were used to obtain a rapid, comprehensive view of the predominant bacterial species present in the samples of raw goat's milk. The relationship between the bacterial species profile and the farm management practices was investigated by statistical analysis.

MATERIAL AND METHODS

Study description

The present work was conducted in the Languedoc Roussillon and Midi-Pyrénées regions among producers of PDO (Protected Designation of Origin) farmhouse Pelardon (11 farms) and Rocamadour cheeses (19 farms), respectively. This study was carried out under real herd management conditions. For the best representation of breeding and milking production practices, the farms were selected by the Rocamadour and Pelardon cheese producers' trade unions. The monitoring period was May and June 2006, because there are great differences between farms in terms of management practices, for example the daily temperature ranged from 18°C and 25°C, and the lactation stage from 3 to 5 months for 70% or more of the goats in each flock.

Data collection

For each farm, a survey, observations and measurements were carried out by the investigators. Variables were categorized in seven families: (1) general characteristics of the farm including the region (2) bedding management practices (3) environmental conditions during and after milking (4) cleaning practices and cleanness of the Milking

Machine (MM) (5) MM handling and characteristics (6) quality and cleaning of the teat (7) cleaning practices of the dairy and milk tank.

Raw milk samples

For each period, three milk samples from the evening milking were collected from each farm. The 3 samples were collected on days 1, 4 and 8 from the tank, cooled to 10°C and stored at -25°C for 15 days. A total of 90 samples were analysed

Temporal Temperature Gradient gel Electrophoresis (TTGE) and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

DNA extraction

60 ml of raw milk samples were digested by addition of 50 mg of pronase (Roche Diagnostics, Meylan, France) and 100 µl of β-mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, Germany) and were incubated for 3 hours in a 52°C water bath. Bacterial pellets were obtained by centrifugation at 12 000 g for 20 min at 4 °C and were washed once with sterile water and once with 10 ml of TES buffer (25 mM Tris-HCl, 0.1M EDTA, 25% [wt/vol] saccharose; pH 8). Supernatants were discarded and bacterial pellets were stored at -20°C. Before experimentation, bacterial pellets were resuspended in 500 µl of TES and the bacteria were mechanically lysed with zirconium beads (diameter, 150 to 200 µm; Sigma, St.Louis, Mo.) by three cycles of 30s of vortexing with 1 min of storage in ice between each cycle. DNA purification was performed as described previously (De los Reyes-Gavilan, 1992).

PCR amplification

The V3 region of the 16S RNA gene is the substrate for PCR amplification.

PCR amplification was performed as described by Lafarge *et al.* (2004).

TTGE and DGGE analysis for identification of bacteria with AT-rich genomes (TTGE) and GC-rich genomes (DGGE)

TTGE and DGGE analysis were performed as described previously (Lafarge *et al.*, 2004).

Analysis of TTGE and DGGE gels

GelCompar software (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) was used to analyse TTGE and DGGE gels. Standardization markers were included in all gels with a standard

gel to adjust for migration difference between gels. Bacterial species isolated from dairy products were then identified by comparison with a reported reference dairy bacteria database (Ogier *et al.*, 2002; Ogier *et al.*, 2004).

Statistical analysis of the data

The TTGE and DGGE profiles were encoded for analysis: all the bands (species) were recorded and scored as 1 if present or 0 if absent for each milk profile.

Descriptive analysis of the bacterial species present in the milk samples

A descriptive analysis of the milk samples was carried out: mean frequency of detection of the various species in the milk samples and number of farms where the species was detected in at least two of the three milk samples collected. Correlations between species were investigated.

Cluster analysis of the bacterial species present in the milk samples

Classes of milk bacterial species were defined. This was achieved through principal component analysis (PCA), then agglomerative hierarchical clustering (AHC) on the PCA factors, followed by classification on the basis of an optimal cut-off level. Bacterial species exhibiting little variability across milk samples from the various farms (i.e. where 90% of milk samples were positive or negative for the species in question) were introduced into the analyses as illustrative PCA variables. This analysis was carried out using SPAD software (version 5.5). In order to study the relationships between the bacterial species classes and farm management practices, it was necessary to assign farms to the class that corresponded to the majority of their milk samples (where two or three of the three milk samples from the farm belonged to the same class). Where the farm's three milk samples belonged to three different classes, the data on this farm were not included in the following analysis.

Identification of farm management practices predictive of milk bacterial profiles

Two approaches were used to investigate the relationships between the presence of bacterial species and farm management practices.

- Identification of farm management practices predictive of bacterial species class

Farm management practices were classified according to their ability to discriminate, in a χ^2 test, between the farms' classes of representative bacterial species.

- Identification of farm management practices predictive of the presence of bacterial species.

The probability of the presence of bacterial species when certain farm management practices were used was described using a mixed logistic model (GLIMMIX procedure, SAS 9.1) adjusted for the farm effect. Logistic regression is a statistical technique that aims to produce a model from a set of observations that is capable of predicting the values of a categorical variable from a series of continuous and/or binary explanatory variables. In our case, the categorical variable is the microbial species, and it has two possible values: no detection or detection. The explanatory variable, the farm management practices, is binary. The effect of farm management practices on the presence of the bacterial species was estimated using their odds ratio. The odds ratio is the ratio of the probability of occurrence of an event (in this case, detection of a species) to the probability of non-occurrence. The between-farm variance relative to the total variance of random effects (sum of the between-farm variances and within-farm variance) is estimated by the coefficient ρ (%). This descriptor is used to assess how much of the variability in the detection of a microbial species is due to between-farm variability and by subtraction, how much is due to within-farm variability. When within-farm variability is high, the effect of the factor in question is reduced.

RESULTS

Some samples could not be processed due to problems with extracting microbial DNA, despite repeated attempts. The results therefore pertain to 81 of the 90 milk samples taken at the 30 farms.

Descriptive analysis of each species and correlation between bacterial species

Three milk samples were analysed for 21 of the farms and 2 milk samples were analysed for 9 of the farms. Analysis of the TTGE and DGGE profiles revealed a high frequency of staphylococci in the milk samples analysed (table 1). Staphylococci were detected in 54% of the samples and were found in samples from 19 farms, including 14 where they were detected in at least 2 of the 3 milk samples from the farm. *Serratia fonticola* and *Serratia marcescens* were also dominant species. They were found in 52% of the milk samples and

in milk from 14 of the farms, including 10 where they were detected in at least 2 of the 3 milk samples analysed. The next most predominant type was *Arthrobacter*, followed by *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis*. Detection of the latter two species was rather sporadic for farms where they were detected in the milk, so although *L.lactis* was detected in milk from 15 farms, it was only present in at least 2 of the 3 milk samples from 6 of them. Similarly, *E. faecalis* was detected in milk from 14 farms, but was only present in at least 2 of the 3 milk samples from 4 of them. Other species were detected at low frequency (less than 20%).

The correlations between species (R values) were low. Significant positive correlations were found between: *S. fonticola*, *S. marcescens* and *C. flavescens* (R = 0.319, p = 0.004), *S. fonticola*, *S. marcescens* and *Arthrobacter* (R=0.273, p=0.014), *E. faecalis* and *Enterobacter* or *Raoultella planticola* (R= 0.364, p=0.001). A negative correlation was found between *L.lactis* and *Brevibacterium linens* (R =-0.275, p= 0.013).

Description of the bacterial species classes

The variability of the distribution of the bacterial species in milk samples was assessed by performing a cluster analysis of the samples on the basis of the bacterial species detected. The milk samples from the 30 farms studied fell into five bacterial species classes. These classes accounted for 56% of the total variability of the milk bacterial species. The species that contributed to the construction of the classes were: *Staphylococcus* spp., *S. fonticola*, and *S. marcescens*, *L.lactis* and *E. faecalis*. The other species were introduced as supplementary variables.

The data on these classes are shown in figures 1 to 5.

- Class A (figure 1): 15 milk samples from 11 farms that contained only 1 to 3 of the 9 species detected. These milk samples therefore exhibited very low species diversity.
- Class B (figure 2): 19 milk samples from 13 farms that predominantly contained *S. fonticola* and/or *S. marcescens* (95% of milk samples on average) and *Arthrobacter* (68%). No enterococci (*E. faecalis* and *E. faecium*) or *L.lactis* were detected in these samples.
- Class C (figure 3): 18 milk samples from 11 farms, which all contained *L.lactis*. The other species were detected at a frequency identical to the total sample, except for *E. faecalis* and *B.linens*, which were not detected in this class.

- Class D (figure 4): 13 milk samples from 7 farms. It was the most stable class in terms of the bacterial species profiles found on each farm, with 4 of the 7 farms where this class was found having 2-3 class D samples (i.e. 57% of farms where at least 2 samples were in the same class, compared to 23–36% for the other classes). These samples all contained *B.linens*, while the other classes did not. The frequency of detection of the other species was the same for all the milk samples analysed, except for *L.lactis* and *E.faecium* which were not detected.
- Class E (figure 5): 16 milk samples from 13 farms. This class was characterized by systematic detection of *E. faecalis* and higher than average detection of *E. faecium*, *Enterobacter* spp. and/or *R. planticola*. It is the class with the highest number of microbial species (8 of the 9 species detected).

Identification of farm management practices predictive of bacterial species class

Twenty of the 30 farms were assigned to the bacterial species profile classes. It was not possible to assign the ten remaining farms to a predominant class because their three milk samples belonged to three different bacterial species classes.

Some specific associations were demonstrated between the farms in the various bacterial species classes and their farming practices (table 2). Bacterial species class A contained 4 farms. This class, which was characterized by low bacterial species diversity, showed a significant association with farms where the milking machine was clean (12 inspected areas found to be clean).

Bacterial species class B, which was characterized by a higher rate of detection of *S. fonticola*, *S. marcescens* and *Arthrobacter* and no detection of lactic acid bacteria (*L.lactis*, *Enterococcus* spp.), was significantly associated with farms where udder trauma (eversion, nodules, enlarged lymph nodes) was found (3 of the 5 class B farms). The farmers in this class (4 of the 5 class B farms) did not monitor somatic cell counts in their herds.

Class C, characterized by the systematic presence of *L.lactis*, contained 4 farms. On 3 of the 4 farms, the milking rooms were in direct contact with the goat housing and had no washable sanitary trap. Three of the 4 class C farms had a clean milking machine.

Class D, in which milk systematically contained *B.linens*, contained 4 farms. These farms all used zero-grazing and did not halt production in winter.

Class E, which exhibited the greatest species diversity and in which *E. faecalis* was systematically detected, was significantly associated with milkers not washing their hands

before milking. Furthermore, as for class D, it was predominantly composed of farms where it was considered that milking machine cleaning was inadequate. Indeed, only 2 of the 7 farms in class D and E had milking machines that were considered clean.

The farms' class assignment was independent of the geographical region in which they were located.

Identification of farm management practices predictive of the presence of bacterial species

The results of the statistical analysis using the mixed logistic model are summarized in table 3. A significant association was found between detection of *L.lactis* and the location of the milking room. Indeed, the probability of detecting *L.lactis* (value of the odds ratio) was 4.2-fold higher when the milking room was in direct contact with the goats' housing. This association was also found with the practices of the representative class C farms, where *L.lactis* was detected in all the milk samples.

The greatest association with the detection of enterococci was lack of hand-washing by milkers: the relative risk compared to milkers who washed their hands was 5.2. This association was also found with class D farms, the class in which enterococci were dominant.

The mean relative risk for the detection of staphylococci in milk on farms that did not use the milk testing system was 5.6, and 4.3 when milking machine tubes were not dried. The absence of homeopathic therapy at "drying-off" seemed to be associated with a high probability of detecting *Serratia fonticola* and *Serratia marcescens* in milk. Indeed, the probability was 6.8-fold higher when no homeopathic therapy was given. The probability of detecting *Serratia* species was also higher when teat cup liners were not changed every year (odds ratio: 5.5).

A higher frequency of detection of *B.linens* was related to the practice of zero-grazing (6.7-fold probability of having *B.linens*). *Arthrobacter* was more commonly detected in milk from farms where the storage facility was not considered clean and those that did not rinse the milking machine with water before it was cleaned (mean odds ratios of 4.4 and 18.7, respectively).

It is important to point out that between-farm variability for the lactic acid bacteria group was low and virtually nonexistent for enterococci ($p < 0.001\%$). The within-farm variability

was therefore high, which minimizes the influence of farm management practices that affect the detection of the bacterial species in question.

For the other bacterial species, no farming practices were associated with a higher probability of detection.

The distribution of the microbial species in the milk samples was independent of the geographical region in which the farm was located.

DISCUSSION

The most commonly detected microflora in the samples of goat's milk analysed were staphylococci (54% of the milk samples and 19 of the farms). These results corroborate those of Valle *et al.* (1991) and Kyozaire *et al.* (2005). The two *Serratia* species, *S. fonticola* and *S. marcescens*, were also predominant microflora (52% of the milk samples, and 14 of the farms). To our knowledge, no studies have yet reported the dominance of the genus *Serratia* in goat's milk. *S. marcescens* has been detected in cow's milk however (Ercolini *et al.*, 2009).

Coryneform bacteria (*Arthrobacter* and *B.linens*) were also detected fairly frequently in the goat's milk samples, especially the genus *Arthrobacter* (nearly 40% of the milk samples and 16 of the farms). *Arthrobacter* spp. have already been detected frequently in goat's milk from one farm (Callon *et al.*, 2007) and in cow's milk from 26 farms (Verdier-Metz *et al.*, 2009). *B.linens* is also frequently detected in cow's milk, as shown in studies by Verdier-Metz *et al.* (2009): 90% of milk samples from 67 farms contained this species. To our knowledge, no studies have reported the presence of this bacterium in goat's milk. *L.lactis* and *E. faecalis* were the two species of lactic acid bacteria most commonly present in the milk samples analysed (28% of the milk samples and 15 of the farms for *L.lactis* and 22% of the samples and 14 of the farms for *E. faecalis*). Among the Lactic acid bacteria, *L.lactis* and *E. faecalis* are the two species most frequently isolated from cow's milk (Corrolier *et al.*, 1998; Dalmaso *et al.*, 2008; Rasolofa *et al.*, 2010), from goat's milk (Badis *et al.*, 2004a; Callon *et al.*, 2007) and sheep's milk (Caridi *et al.*, 2003). The low detection frequency of Enterobacteria, *E. faecium*, and *C. flavesceus* corroborate previous studies by other authors on goat's milk (Callon *et al.*, 2007) and cow's milk (Ercolini *et al.*, 2009; Giannino *et al.*, 2009; Verdier-Metz *et al.*, 2009). Thus, the species most frequently detected in milk tend to be microflora of technological importance in cheese-making.

Staphylococci and corynebacteria are ripening microflora that contribute to the flavour and appearance of the cheese (Hermier *et al.*, 1992). *L.lactis* is the species most frequently cited for its acidifying capacity (Casalta *et al.*, 1995; Lafarge *et al.*, 2004) and its involvement in the production of flavour and aromas (Corroler *et al.*, 1999).

However, in cheese-making technology, *Serratia* tends to be classified among the spoilage microflora (Coiffier, 1992).

The association between farm management practices and both milk bacterial classes and the presence of individual bacterial species reveals farm management practices that differ according to bacterial class or the bacterial species detected, independently of the region.

The cleanness of the milking machine is a determining factor in the diversity of the species present in the milk. Thus, the class A microbial species profile, characterized by low bacterial species diversity in the milk (at most 3 out of the 9 species detected) and the absence of lactic acid bacteria, was significantly associated with milking machines for which all the areas inspected were clean. This result is consistent with those of Verdier-Metz *et al.* (2009) in cows, in which the diversity index declined when milking hygiene was improved.

The presence of *Serratia* in milk was significantly associated with the health of the herd (udder health and monitoring of the herd's health). It is highly probable that the presence of *Serratia* in milk is partially due to contamination of the teat surface or subclinical mastitis. Indeed, previous studies have shown that *S. marcescens* is an opportunistic pathogen of environmental origin that is sometimes involved in subclinical mastitis in ruminants (Todhunter *et al.*, 1991; Bergonnier *et al.*, 2003). The probability of detecting *Serratia* was also higher when teat cup liners are not changed annually. Worn liners are often cracked, which could favour their colonization by microflora derived from the udders.

The frequency of detection of staphylococci in milk was also significantly associated with absence of herd monitoring by the milk testing system. Staphylococci and in particular coagulase-negative staphylococci are the bacteria most commonly responsible for subclinical mastitis in goats (Bergonnier *et al.*, 2003). Subclinical mastitis is more likely to develop in herds that are not subjected to health monitoring. However, this hypothesis remains to be verified because staphylococci belong to the normal skin flora of animals and humans.

The probability of detecting *B.linens* more frequently was higher in zero-grazing herds, a practice that is highly correlated with continuous milk production. To our knowledge, no studies have reported this result. *B.linens* is widespread in nature. However, its presence has been shown in very diverse environments: soil (Crombach, 1974), bedding (Schefferle, 1966; Mohan, 1981), plants (Keddie *et al.*, 1966; Owens and Keddie, 1969), dairy products (Abd-El-Malek and Gibson, 1952; Jayne-Williams and Skerman, 1966; Crombach, 1974) and human skin (Pitcher and Noble, 1978). The higher frequency of detection of *B.linens* in herds that are kept indoors may be due to a higher microbial concentration of this ubiquitous species (permanent contact with bedding, potentially greater air contamination on account of the constant presence of the animals inside the buildings, etc.). Furthermore, the milking machine is in continual contact with milk (continuous milk production for zero-grazing herds). There may therefore be greater contamination of the milking machine with *B.linens* from milk.

The frequency of detection of enterococci and in particular *E. faecalis* was associated with milkers' standards of hygiene and to a lesser extent with animal density. Warm-blooded animals, plants and insects are the normal hosts of enterococci (Facklam *et al.*, 2002), so it stands to reason that they should be found frequently when standards of hygiene are poor.

As for *L.lactis*, it was most often present when the milking room was in direct contact with the goats' housing. Klijn *et al.* (1995) isolated strains of *L.lactis* from dairy farm environments (from the cattle's udders, skin and saliva, soil near the livestock housing, feed, silage and fresh grass, so these environments could be partially responsible for introducing *L.lactis* to the milk. Fodder in the bedding could also be a source of contamination with lactic acid bacteria, as has been demonstrated for certain lactobacilli (Bouton *et al.*, 2005). Thus, during milking, permanent contact with the goats' housing would tend to favour contamination of the milk with *L.lactis*.

CONCLUSION

The predominant bacterial flora in the milk from the farms studied belonged to species of the genera *Staphylococcus*, *Arthrobacter* and *Serratia*. The lactic acid bacteria species *L.lactis* and *E. faecalis* were detected in about 25% of the milk samples. *B.linens* was detected systematically in milk from farms using zero-grazing.

The association between bacterial species and farm management practices shows that it is eventually possible to identify factors in farm management that can be used to improve control over the microbiological quality of milk intended for cheese production, independently of the region studied. The milking machine and especially its cleanness were determining factors for bacterial species diversity in the milk samples. Herd health management was also a key factor for the balance of the bacterial flora. Inferior herd health conditions and infrequent monitoring favoured contamination with *S. fonticola* or *Staphylococcus* spp.

When hygiene standards are observed, particularly those applying to milkers, the fact that direct contact between milking rooms and the goats' housing enriches the milk in *L.lactis* (a lactic acid bacteria of technological interest in cheese production) is an interesting result that merits further investigation. The latter conclusion needs to be examined in more detail through molecular analysis of the *L.lactis* strains present in the environments close to the herd (fodder, bedding, udders, air) to evaluate their similarity with the strains present in the raw goat's milk, for greater understanding of the sources of *L.lactis*. This future work would make it possible to identify the main origin of the strains of *L.lactis* found in the milk.

This study was supported by the Midi-Pyrénées Conseil Régional and the association GALA (Janzé, France).

Acknowledgements: The authors would like to thank the technicians and farmers from the Pelardon and Rocamadour regions for their involvement in this study and Jean-Claude Ogier for his help in the microbial analysis.

References

- Abd-El-Malek, Y and T, Gibson, 1952. Studies in the bacteriology of milk. III. The corynebacteria of milk. *J.Dairy Res*, 19 : 153-159.
- Alonso-Calleja, C., J, Carballo., R, Capita., A, Bernardo and M.L, Garcia-Lopez, 2002. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 34 : 134-138.
- Badis, A., D, Guetarni., B.M, Boudjema., D.E, Henni and Kihal, M, 2004a. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21 : 579-588.
- Badis, A., D, Guetarni., B, Moussa-Boudjemaa., D.E, Henni., M.E, Tornadijo and M, Kihal, 2004b. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology*, 21 : 343-349.
- Bergère, J-L and C, Tourneur, 1992. Les bactéries de surface des fromages. In: les groupes microbiens d'intérêts laitiers ed. CEPIL.pp127-163. Paris.
- Bergonnier, D., R, De Crémoux., R.,Rupp., G, Lagriffoul and X Berthelot, 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res*, 34 : 689-716.
- Beuvier, E., K, Berthaud., S, Cegarra., A, Dasen., S, Pochet., S, Buchin., G, Duboz., 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal*, 7 : 311-323.
- Bouton, Y and R, Grappin, 1995. Comparison of the final quality of a swiss-type cheese made from raw or microfiltered milk. *Lait*, 75: 31-44.
- Bouton, Y., L, Tessier., T.P, Guyot and E, Beuvier, 2005. Relation entre les pratiques des producteurs et les niveaux de populations microbiennes des laits à Comté (Relationships

- between dairy farmer practices and the level of microbiological population in milk used for Comté cheese making). In: INRA , IE (Eds), Renc. Rech. Ruminants, 12 : 403.
- Buchin, S., V, Delague., G, Duboz., J.L, Berdague., E, Beuvier., S, Pochet. and R, Grappin, 1998. Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of a semi-hard cheese. *Journal of Dairy Science*, 81 : 3097-3108.
- Callon, C., F, Duthoit., C, Delbes., M, Ferrand., Y, Le Frileux., R, De Cremoux and M.C Montel, 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Systematic and Applied Microbiology*, 30 : 547-560.
- Casalta, E., Y, Vassal., M.J, Desmazeaud and F, Casabianca, 1995. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus-lactis* isolated from Corsican goat milk and cheese. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28 : 291-299.
- Coiffier, O., 1992. Les bactéries coliformes. In : les groupes microbiens d'intérêts laitiers ed. CEPIL.pp303-323. Paris.
- Corroler, D., I, Mangin., N, Desmasures. And M, Gueguen, 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Appl Environ Microbiol*, 64 : 4729-4735.
- Crombach, W.H., 1974. Relationships among coryneform bacteria from soil, cheese and sea fish. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* , 40 : 347-359.
- Dalmaso, M., S, Prestoz., V, Rigobello and Y, Demarigny, 2008. Behavior of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* in a Four *Lactococcus* Strain Starter during Successive Milk Cultures. *Food Science and Technology International*, 14 : 469-477.
- Delosreyesgavilan, C.G., G.K.Y, Limsowtin., P, Tailliez., L, Sechaud. and J.P, Accolas, 1992. A lactobacillus-helveticus-specific DNA probe detects restriction-fragment-length-polymorphisms in this species. *Applied and Environmental Microbiology*, 58 : 3429-3432.

- El-Gazzar, F.E., Bohner, H.F and E.H, Marth, 1992. Antagonism between *Listeria monocytogenes* and lactococci during fermentation of products from ultrafiltered skim milk. *Journal of Dairy Science* : 75, 43-50.
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F., 2009. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 26 : 228-231.
- Facklam, R., M.G, Carvalho and L, Teixeira, 2002. History, taxonomy, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance* ed. Gilmore, M.pp 1-54. Washington, DC: ASM Press.
- Foschino, R., A, Invernizzi., R, Barucco and K, Stradiotto., 2002. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69 : 213-225.
- Gay, M and A, Amgar, 2005. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. *Lait*, 85 : 153-170
- Giannino, M.L., M, Marzotto., F, Dellaglio and M, Feligini, 2009. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 130 : 188-195.
- Jayne-Williams, D.J and T.M, Skerman., 1966. Comparative studies on coryneform bacteria from milk and dairy sources. *J.Appl. Bacteriol.*, 29 : 72-92.
- Keddie, R.M., B.G.S, Leask and J.M,Grainger, 1966. A comparison of coryneform bacteria from soil and herbage: Cell wall composition and nutrition. *J.Appl. Bacteriol*, 29 : 17-43.
- Klijn, N., A.H, Weerkamp and W.M.,De Vos, 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol*, 61 : 788-792.

- Kyozaire, J.K., C.M, Veary., I.M, Petzer and E.F, Donkin, 2005. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. *Journal of the South African Veterinary Association-Tydskrif Van Die Suid-Afrikaanse Veterinere Vereniging*, 76 : 69-73.
- Lafarge, V., J.C, Ogier., V, Girard., V, Maladen., J.Y, Leveau., A, Gruss and A, Delacroix-Buchet, 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 : 5644-5650.
- Michel, V., A, Hauwuy and J.F, Chamba, 2001. Raw cowmilk microflora: diversity and influence of conditions of production. *Lait*, 81 : 575-592.
- Michel, V., A, Hauwuy., M.C, Montel., J.B, Coulon and J.F.Chamba, 2005. Pratiques d'élevage et composition microbienne des laits crus (Breeding practices and microbial composition of raw milks). In: *Territoires et enjeux du développement régional*. Lyon, 9-11 Mars 2005. INRA.
- Mohan, K., 1981. *Brevibacterium* species from poultry. *Antonie van Leeuwenhoek*, 47, 449-453.
- Ogier, J.C., V, Lafarge., V, Girard., A, Rault., V, Maladen., A, Gruss., J.Y, Leveau and A, Delacroix-Buchet, 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 : 5628-5643.
- Ogier, J.C., O, Son., A, Gruss., P Tailliez.,, 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.
- Owens, J.D and R.M, Keddie, 1969. The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. *J.appl.Bacteriol.*, 32 : 338-347.
- Pitcher, D.G and W.C, Noble, 1978. Aerobic diphtheroids of human skin. In: *Coryneform Bacteria*. Ed. Bousfield (I.J) and Callely (A.G), London, Academic Press.

- Rasolofo, E.A., D, St-Gelais., G, LaPointe and D, Roy, 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology*, 138 : 108-118.
- Schefferle, H.E., 1966. Coryneform bacteria in poultry deep litter. *J.appl.Bacteriol.* 29, 147-160.
- Todhunter, D.A, K.L, Smith and J.S, Hogan, 1991. *Serratia* species isolated from bovine intramammary infections. *J Dairy Sci*, 74 : 1860-5.
- Valle, J., S, Piriz., R, de la Fuente and S, Vadillo, 1991. Staphylococci isolated from healthy goats. *Zentralbl Veterinarmed B*, 38 : 81-89.
- Veisseyre, R., 1975. *Technologie du lait : constitution, récolte, traitement et transformation du lait*. Ed La Maison Rustique, Paris.
- Verdier-Metz, I., B, Martin., P, Pradel and J.B, Coulon, 2002. Combined effect of the breed and the type of forage on the cheese characteristics: interaction with the cheese-making used. *9th Meeting on Ruminant Research*, 355-358.
- Verdier-Metz, I., V, Michel., C, Delbes and M.-C, Montel, 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology (London)* 26, 305-310.

Tables et figures

Table 1: Frequency of detection of bacterial species (in ascending order) in the milk samples and the number of farms where the various species were detected.

Bacterial Species	Frequency of detection in milks (%)	Number of farms in which species were detected	Number of farms in which species were detected at least in 2 among the 3 milks
<i>Enterobacter</i> spp, <i>R.planticola</i>	3,14	4	2
<i>E. faecium</i>	6,05	5	0
<i>C.flavescens</i>	8,39	4	2
<i>B linens</i>	15,67	7	4
<i>E. faecalis</i>	22,22	14	4
<i>L.lactis</i>	28,06	15	6
<i>Arthrobacter</i> spp.	39,86	16	12
<i>S.fonticola</i> , <i>S.marcescens</i>	52,00	14	10
<i>Staphylococcus</i> spp.	53,60	19	14

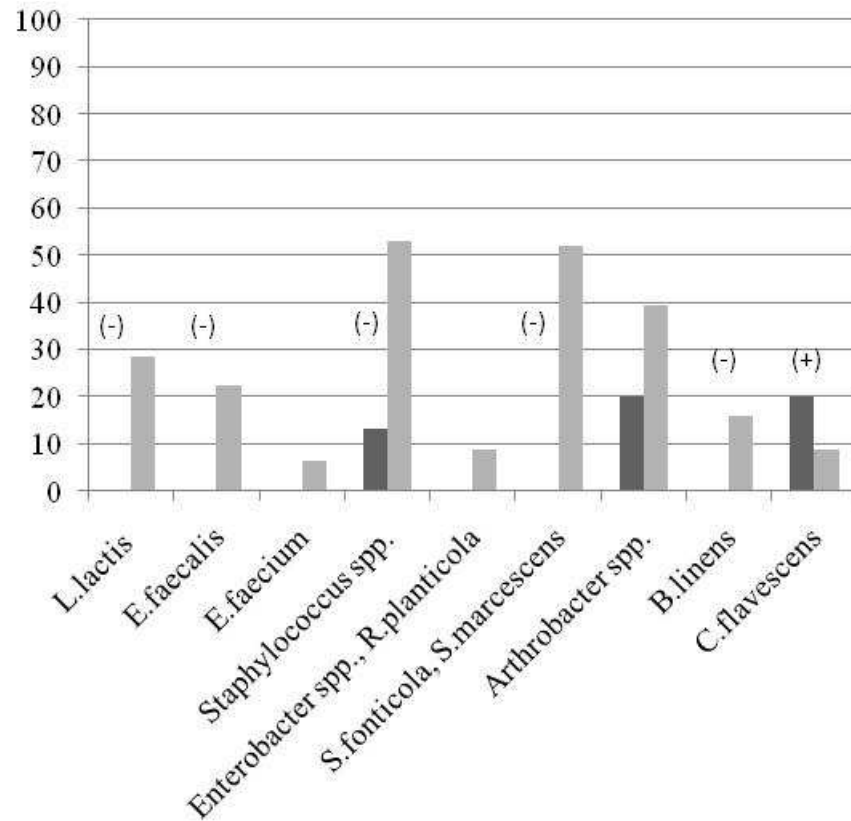


Figure 1: Mean frequency of detection of the bacterial species in class A milk samples (■) and in all the samples (■). The signs between brackets indicate a significant difference (lower or higher frequency) between class A and the total sample ($p < 0.05$).

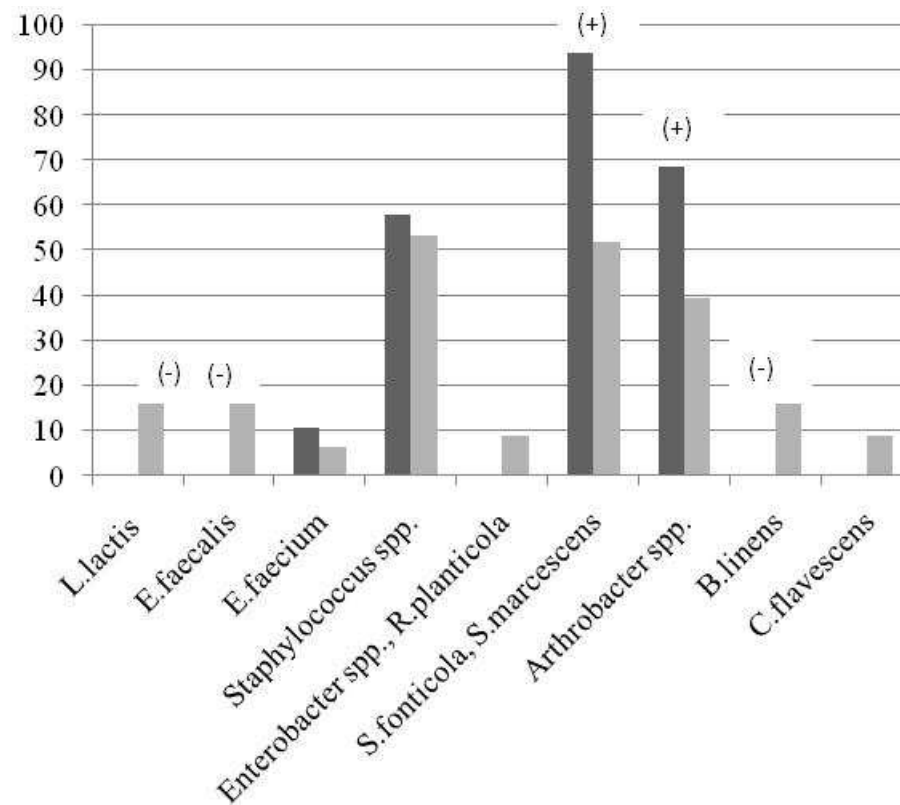


Figure 2: Mean frequency of detection of the bacterial species in class B milk samples (■) and in all the samples (■). The signs between brackets indicate a significant difference (lower or higher frequency) between class B and the total sample ($p < 0.05$).

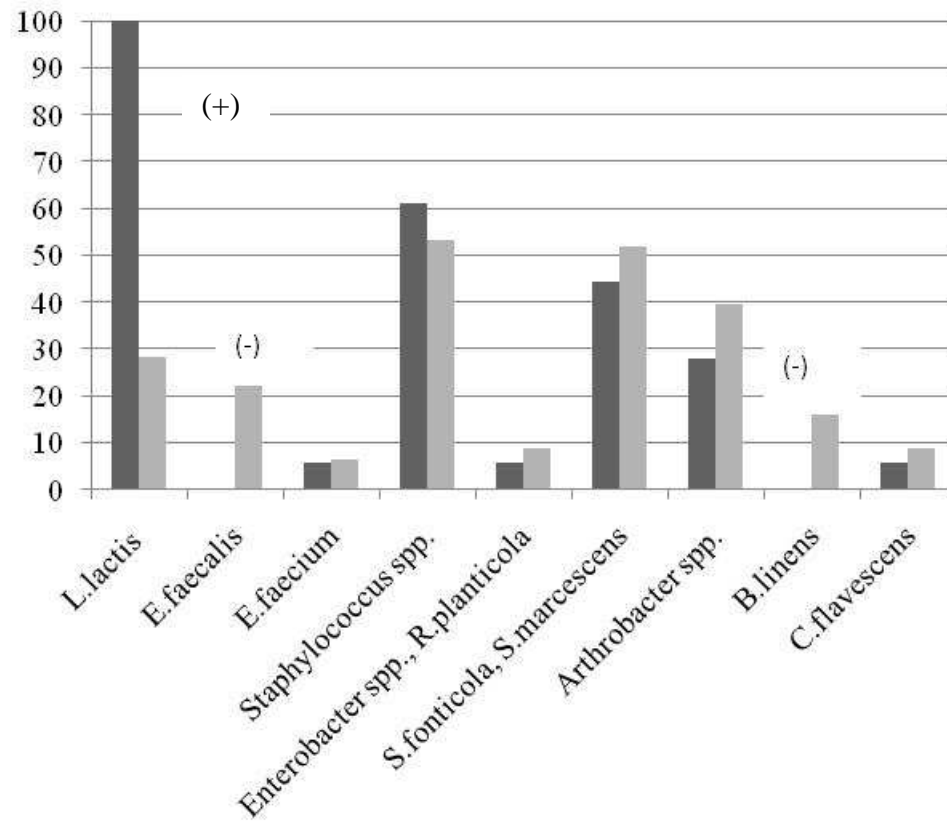


Figure 3: Mean frequency of detection of the bacterial species in class C milk samples (■) and in all the samples (■). The signs between brackets indicate a significant difference (lower or higher frequency) between class C and the total sample ($p < 0.05$).

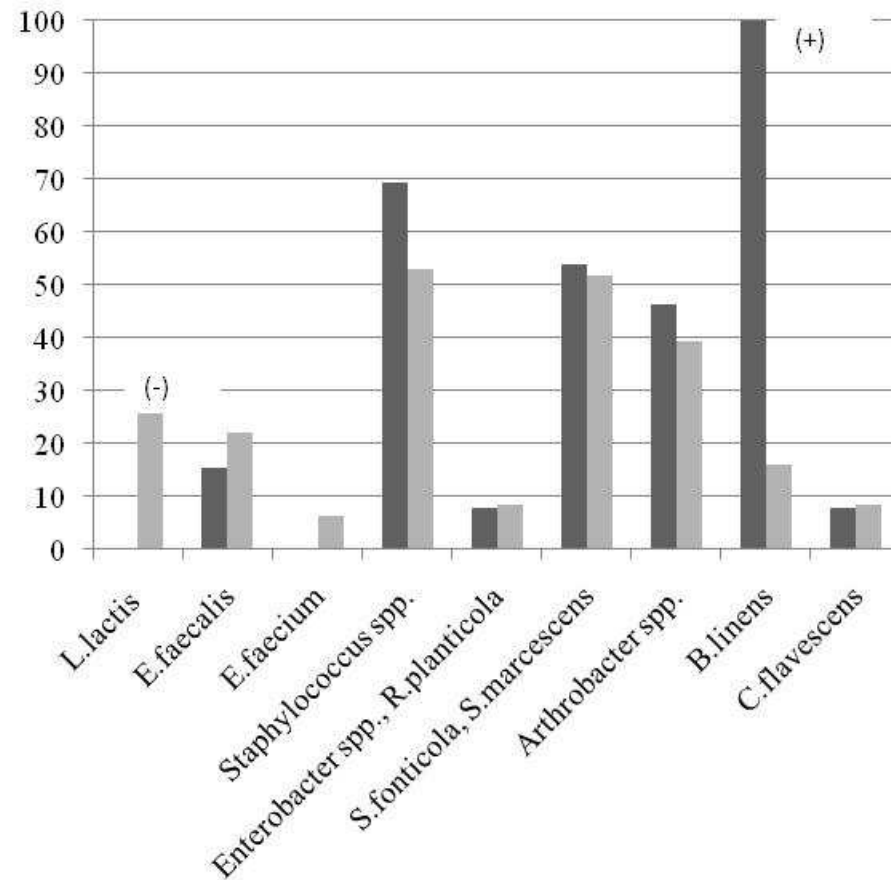


Figure 4: Mean frequency of detection of the bacterial species in class D milk samples (■) and in all the samples (■). The signs between brackets indicate a significant difference (lower or higher frequency) between class D and the total sample ($p < 0.05$).

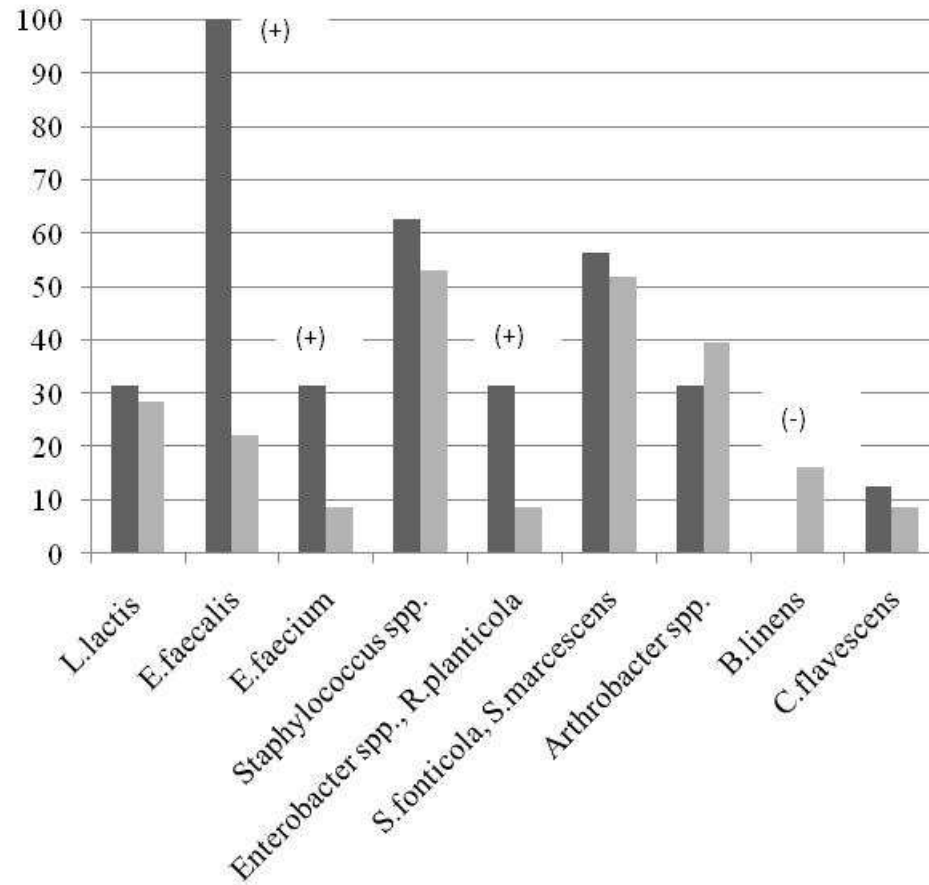


Figure 5: Mean frequency of detection of the bacterial species in class E milk samples (■) and in all the samples (■). The signs between brackets indicate a significant difference (lower or higher frequency) between class E and the total sample ($p < 0.05$).

Table 2: Breakdown of the farms according to management practices and bacterial species class (the numbers in bold type are farms associated with an over- or under-represented microbial species class ($p < 0.05$)).

Management practices	Number of farms	Bacterial species class				
		A	B	C	D	E
		Number of farms according to the bacterial species class				
		4	5	4	4	3
Milking machines for which all the areas inspected were clean	11	4	2	3	1	1
Udders with nodularity or nodes	4	1	3	0	0	0
No monitoring of the somatic cells	8	0	4	2	1	1
Sanitary trap not washable	5	2	0	3	0	0
Milking parlour in direct contact with the goats' housing	6	0	1	3	0	2
Milkers who didn't washed their hands before milking	7	1	1	1	1	3
Zero-grazing	7	0	2	1	4	0
Continuous milk production	8	0	3	1	4	0

Table 3: Farm management practices significantly associated with bacterial species

Bacterial species	Farm management practices	Probability of the detection of the species (%)	Odd-Ratio	P(%)	ρ (%)
<i>L.lactis</i>	Milking parlour in direct contact with the goats' housing vs no direct contact	46,78 vs 17,43	4,16	4,04	33,03
<i>E. faecalis</i> ; <i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i> : lack of hand-washing by milkers vs hand-washing	47,67 vs 14,98	5,17	0,80	0,00
	Animal density $\leq 2,5\text{m}^2/\text{goat}$ vs $>2,5\text{m}^2/\text{ch\`evre}$	47,05 vs 20,29	3,44	3,79	0,00
	No milk control vs milk control	69,22 vs 28,64	5,6	1,53	43,84
<i>Staphylococcus</i> spp.	No drying of the internal fields of the milking machine vs drying	72,40 vs 37,92	4,29	3,90	45,71
	teat cup liners were not changed every year vs removal every year	70,73 vs 30,41	5,55	2,07	54,70
<i>Serratia fonticola</i>	Absence of homeopathic treatment vs homeopathic treatment	64,97 vs 21,46	6,79	2,20	54,19
<i>B.linens</i>	Zero-grazing vs grazing	31,23 vs 6,50	6,67	4,10	34,15

CHAPITRE V

***CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET
GÉNOTYPIQUE DES BACTÉRIES LACTIQUES
ISOLÉES DE LAIT DE CHÈVRE ET INFLUENCE
DES CARACTÉRISTIQUES D'ÉLEVAGE SUR LES
ESPÈCES DOMINANTES***

1 - INTRODUCTION

L'analyse des profils TTGE (chapitre IV) montre que *L.lactis* et *Enterococcus* spp. sont les bactéries lactiques détectées les plus fréquemment dans les laits et que les conditions d'élevage influent sur les profils d'espèces bactériennes.

La méthode PCR-TTGE présente l'avantage d'être rapide et permet de détecter les espèces bactériennes. Cependant, ne sont détectées que les espèces majoritaires. D'autre part, l'identification des espèces n'est en fait qu'une assignation à une espèce (comparaison par rapport à un référentiel d'espèces existant). Cette partie se focalise sur la caractérisation des bactéries lactiques mésophiles (genres, espèces sous-espèces). La dominance de ces microorganismes dans les laits est recherchée car ils jouent un rôle déterminant en transformation fromagère (acidification, implication dans l'élaboration de levains lactiques naturels). Une première étude a été réalisée dans 17 élevages issus des 38 élevages choisis aléatoirement provenant des zones géographiques des AOP Rocamadour et Pélardon. Les isolats issus des laits de ces exploitations, prélevés sur une gélose élective par rapport aux bactéries lactiques ont été caractérisés par méthodes phénotypiques, chimiotypiques et génotypiques. Quel que soit la zone considérée, le génotype *Lactococcus lactis lactis* est dominant au sein de l'espèce *L.lactis*.

Afin de valider ce résultat car la détection de *L.lactis cremoris* est peu fréquente dans les laits des élevages (un seul élevage dont la majorité des souches appartiennent à cette sous-espèce), une zone géographique supplémentaire, la Franche-Comté a été investiguée. Cette région a été choisie en raison de conditions différentes (climat, installations de traite) ayant un impact potentiel sur la répartition des espèces de bactéries lactiques dans le lait. Les élevages de Franche-Comté ont en effet la particularité d'utiliser des pots trayeurs contrairement aux exploitations des deux autres zones qui sont toutes équipées de lactoducs. Cette spécificité est importante car les conditions de nettoyage (automatique à semi-automatique pour les installations de traite équipées d'un lactoduc, nettoyage manuel des bidons pour les installations équipées de pots trayeurs) sont différentes. Ces conditions peuvent avoir une influence sur la répartition des espèces microbiennes des laits comme cela a été montré par Verdier-Metz *et al* (2009).

Quatre élevages issus de cette troisième région ont été suivis et les laits analysés. Les liens entre conditions d'élevage et espèces ou sous-espèces de bactéries lactiques ont été recherchés.

L'analyse globale des laits des trois régions ainsi que l'étude des effets de la région et des conditions d'élevage sur la répartition des espèces et sous-espèces de bactéries lactiques ont fait l'objet de la publication insérée ci-après.

H. Tormo , D. Ali Haimoud Lekhal, C.Roques

« Phenotypic and Genotypic characterization of lactic bacteria of raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria »

International Journal of Food Microbiology (soumise pour publication)

3 - PUBLICATION

**PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISATION OF
LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM RAW GOAT MILK
AND EFFECT OF FARMING PRACTICES ON THE DOMINANT
SPECIES OF LACTIC ACID BACTERIA**

Hélène Tormo a*, Djamila Ali Haimoud Lekhal a, C. Roques b

a Université de Toulouse ; Ecole d'Ingénieurs de Purpan ; 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, Fr

b Université de Toulouse ; UPS ; LU 49, Adhésion bactérienne et formation de biofilms ; 35 chemin des maraîchers, F- 31 062 Toulouse cedex 9, France

* Corresponding author: Tormo Hélène, Mailing address: laboratoire de microbiologie, Ecole d'Ingénieurs de Purpan, 75, voie du TOEC, BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France Phone: +33 5 61 15 29 94; Fax: +33 5 61 15 30 60. E-mail: helene.tormo@purpan.fr.

Keywords: goat, milk, management practices, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*

ABSTRACT

Lactic acid bacteria, in particular *L. lactis*, play a decisive role in the cheese making process and more particularly in lactic cheeses which are primarily produced on goat dairy farms. The objective of this study was therefore to identify the main lactic acid bacteria found in raw goats' milk from three different regions in France and evaluate if certain farming practices have an effect on the distribution of species of lactic acid bacteria in the various milk samples. Identification at genus or species level was carried out using phenotypic tests, SDS-PAGE whole-cell protein profile analysis, genotypic methods including repetitive element REP-PCR, species-specific PCR and 16S rDNA gene sequencing. The distribution of the main bacterial species in the milk samples depends on the farms and their characteristics. Out of the 146 strains identified, *L. lactis* was the dominant species (60% of strains), followed by *Enterococcus* (38%) of which *E. faecalis* and *E. faecium*. The *lactis* genotype was detected more frequently than *L.lactis cremoris* (74% vs. 26%). The predominance of *L. lactis cremoris* depends on the geographical area studied. It appears that the animals' environment (bedding, direct contact of the goat shed with the milking parlour) plays a role in the balance between the dominance of *L. lactis* and Enterococci in raw goats' milk.

Keywords: *Lactococcus lactis*; *Enterococcus* spp; goat milk; SDS-PAGE; REP-PCR; 16S rRNA gene sequencing; farming practices.

INTRODUCTION

The sensorial particularity of farmhouse goats' cheese is partly linked to the use of raw milk of which the properties vary according to farming practices that are specific to each farm. The physico-chemical characteristics of milk depend on the breed of goat and the feed, which in turn influence the technological and sensorial characteristics of the cheeses. The microbial flora in raw milk is also a key characteristic in cheese quality as it increases the diversity of flavours (Steele et Unler., 1992 ; Fox *et al.*, 1996 ; Lynch *et al.*, 1997). Due to their acidifying capacity, lactic acid bacteria play a key role in the acidification of the curd essential to cheese making, but they also contribute to cheese aroma and texture as they possess endo and exopeptidases which are involved in the production of sapid molecules; they generate precursors of aromatic compounds (Mauriello *et al.*, 2001 ; Herreros *et al.*, 2003). Lactic acid bacteria are also very important in the manufacturing of farmhouse raw goats' milk cheese as the coagulation at low temperature (20°C) lasts approximately 24 hours. The whey, rich in *Lactococcus lactis* (Tormo et Talliez., 2000), is used as a natural lactic starter. Raw milk is often described as a major source of lactic acid bacteria in the whey (Bachmann *et al.*, 1996 ; Centeno *et al.*, 1996 ; Manopoulou *et al.*, 2003 ; Duthoit *et al.*, 2005) and so it is important, particularly for these cheeses, to control the microbiological quality of the milk as the success of the whey and the cheese depends on it. The dominance of *L. lactis* in the whey is a factor of success (Demarigny *et al.*, 2006). Raw milk, rich in *L. lactis* may therefore be very interesting, particularly for this type of cheese making. Certain studies have shown that the microbiological characteristics of milk depend on the farm and the farming practices (Michel *et al.*, 2001 ; Verdier-Metz *et al.*, 2009 ; Tormo *et al.*, 2010). However, to date, no studies have been undertaken which look at the relationships between the species of lactic acid bacteria found in raw milk and the farming practices.

The objective of this study was to (i) identify the major lactic acid bacteria in raw goats' milk that potentially have the capacity to acidify raw milk. The bacteria were identified using phenotypic tests, SDS-PAGE whole-cell protein profile analyses and genotypic methods including repetitive element REP-PCR, species-specific PCR techniques, 16S rDNA gene sequencing; (ii) to evaluate the relationship between farm practices and the distribution of dominant species of lactic acid bacteria in raw goats' milk.

MATERIAL AND METHODS

Choice and monitoring of farms

The 21 farms selected were all farms producing farmhouse goats' cheese from the three geographical areas: PDO Rocamadour (11 farms), Pélardon (6 farms) and Franche-Comté (4 farms). They were chosen on the basis of their diverse farming practices and methods of milk production and were representative of their region. The size of the farms also varied. The practices were monitored in May and June 2006 and the information is summarised in table 1. For each farm, milk samples were collected after milking; the samples were cooled to 10°C and frozen at -25°C for a maximum of one month.

Isolation and purification of lactic acid bacteria

Elliker medium modified according to Chamba et al (1981) was chosen for the isolation and culture of lactic acid bacteria. This selective medium is used to count acidifying bacteria of which the majority are lactic acid bacteria.

After inoculation in the mass of 1 ml of 1/10 and 1/100 dilutions of milk in sterile buffered peptone water (Biomérieux, France) and incubation 72h at 20°C, approximately ten acidifying bacterial colonies (colonies with yellow halo) were isolated from the suitable dilution (between 30 and 100 colonies in the Petri dish) and incubated in Elliker broth overnight at 30°C. The isolates were purified by subculture on Elliker agar (48h, 30°C), then incubated overnight at 30°C in Elliker broth. The bacterial pellets obtained were frozen and stored at -80°C in reconstituted sterile semi-skimmed milk (150g/l) with 20% glycerol (500 µL of pellet in 500 µL of broth).

General procedure for identification of lactic acid bacteria

Firstly the bacterial isolates were characterized using phenotypic tests in order to verify that the isolates were lactic acid bacteria. Strains belonging to groups of lactic acid bacteria with different phenotypic profiles and from milk samples from different farms were selected for the continuation of the characterisation (whole-cell protein profiles, species-specific PCR, REP-PCR).

Phenotypic characterisation of the isolates

The Gram positive, catalase negative isolates were analysed at genus level. The growth of the isolates on Elliker broth (AES laboratories, Combourg, France) at 10°C for a week, at 45°C, pH 9.6 and 6.5% (P/V) salt for 96 hours as well as growth in "litmus milk" was tested. The isolates identified as belonging to the genus *Lactococcus* were characterised at species and subspecies level using the following tests: growth in Elliker broth (DIFCO, France) with 4% salt and at 40°C, ability to ferment maltose, ribose, sorbitol and raffinose in MRS broth (DIFCO, France). The presence of an arginine dihydrolase was investigated in BHI broth with 0.3% arginine. After incubation 24 hours at 30°C, 2 to 3 drops of Nessler reagent were added. An orange precipitate indicates the presence of the NH₃.

Whole-cell Protein Patterns

The procedure described by Demarigny *et al.* (2006) was used. Digitized gel pictures of whole-cell proteins were normalized by comparison with reference bands (G-Box, SYNGENE). A visual comparison of the profiles of the proteins from the strains for which the DNA fragments had been sequenced was made with the other profiles.

PCR-Based method

DNA extraction

Strains were incubated at 30°C for 24h in MRS broth and genomic DNA was extracted using the Nucleospin tissue kit (Macherey Nagel, 67 722 Hoerd, France).

Partial 16S rRNA sequencing

The strains with different profiles (phenotypic, SDS-PAGE, Rep-PCR) were sequenced and subsequently assigned at species or subspecies level. The protein profiles and the REP-PCR profiles of the non sequenced strains was compared to the profiles of the strains for which the DNA fragments have been sequenced in order to assign these strains at species or subspecies level.

The 16S rDNA gene (V1-V4) was amplified by PCR using primers E8F and E807R (Baker *et al.*, 2003). DNA was amplified in 50 µL volumes containing 50 ng of template, 500µM dNTPs, 5µM of the respective primers, 2.5U of Taq DNA polymerase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and Thermopol buffer 10X. PCR products were cleaned using

QUIAquick columns (Qiagen, France) according to the manufacturer's instructions and subsequently commercially sequenced (Eurofins MWG biotech, 91967 Les Ulis, France) using primer E8F. The analysis of the chromatograms and the multiple alignments were carried out using MEGA 4.1 software (Tamura et al, 2007). Subspecies identification was carried out by construction of a phylogenetic tree (using MEGA 4.1, Neighbor Joining method, bootstrap 1000) using the sequences obtained from the sequencing and the sequences of Firmicutes species acquired on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

The primer sequences and the PCR amplification conditions are recapitulated in table 2.

PCR amplification

The strains were confirmed to belong to *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* or Enterococci by means of a PCR-based method. *Lactococcus lactis* subsp *lactis* or subsp *cremoris* were identified using primers His 1 and His 2 (Corrolier *et al.*, 1998). Enterococcal DNA was amplified using primers Conrev 23 and Genter according to Frahm *et al.* (1998). In all cases, amplification reactions were performed in a final volume of 25 μ l containing 1X reaction PCR buffer (Qiagen, France), 0.3 μ M of each opposing primer, 2.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 U Taq polymerase and 5 μ L of DNA.

Inter-Repetitive Extragenic sequences were amplified by means of two 18-mer primers in combination (REP 1R-Dt, REP 2-D) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) as described in other publications (Versalovic *et al.*, 1991; Berthier *et al.*, 2001). The final PCR reaction mixture was 25 μ L: 2 μ M of each of the PCR primers REP-1 and REP-2, 200 μ M of each of the desoxyribonucleotides (dNTP) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 0.4 units of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), PCR Buffer 1X with MgCl₂ (1/10th of total volume) (SIGMA, France) and 5 μ L of extracted DNA.

The primer sequences and the PCR amplification conditions are recapitulated in table 2. The amplification cycles were performed with a thermal cycler (Gene Amp PCR System 9700, Perkin Elmer), then 25 μ L of PCR product were electrophoresed in a 10g.l⁻¹ Seakem GTG agarose gel (Sigma) in TBE (Tris-Borate-EDTA pH8) at 100 V for 3h. The 123-pb DNA ladder (Invitrogen, 95613 Cergy Pontoise, France) was used as a size standard. The DNA fragments were stained with ethidium bromide (Sigma), examined under UV light (312nm) and photographed (G-Box, SYNGENE). Digitized gel pictures of Rep-PCR were normalized by comparison with reference bands (G-Box, SYNGENE). A visual

comparison of the REP-PCR profiles from the strains for which the DNA fragments had been sequenced was made with the other profiles.

Statistical analysis

For each farm, a dominant species or genus was assigned (70% of the isolates for each farm) with a dominant species or genus). The relationships between the dominant species or genus on the farm and the management practices were studied using Pearson's chi-square test (SPAD version 5.5, Pantin, France).

RESULTS

Phenotypic characterization of isolates

A total of 204 out of the 206 isolates had a *Lactococcus* or *Enterococcus* phenotype. For these 204 isolates, 6 phenotypic profiles were distinguished (table 3). Profiles A and B correspond to the phenotype *Enterococcus* (47.5% of the strains). These two profiles differ in their capacity to coagulate milk: the isolates in group A do not coagulate milk, whereas those in group B do. Profiles C, D, E and F correspond to the phenotype *Lactococcus lactis* (52.5% of the strains). The strains belonging to profiles D, E and F have the phenotype *L. lactis* subsp. *lactis* as they can grow in the presence of 4% NaCl, at 40°C, hydrolyze arginine and produce acid in the presence of maltose. The strains in groups E and F can grow at pH 9.2. The strains in group E can grow in the presence of 6.5% NaCl. The strains in group C have an unusual phenotypic profile as they do not grow at 40°C and do not hydrolyze arginine. They have a phenotype similar to that of *L. lactis cremoris* even though they grow in the presence of 4% salt and most grow at pH 9.2. A total 146 strains out of the 206 were selected according to their different phenotypic profiles (belonging to the different groups A, B, C, D, E and F) and characterized (protein profiles, genotypic characterization).

Whole-cell Protein characterization of isolates

Figure 1 presents the protein profiles of the sequenced bacterial isolates. The profiles of the other isolates were compared with the profiles of the sequenced isolates. The species identified were *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. lactis*. It was difficult to differentiate between *E. faecalis* and *E. faecium* using the SDS-PAGE profiles whilst the profiles of the subspecies *lactis* and *L. lactis cremoris* were distinctly different (figure 1). Eighty-two strains had

protein profiles assigned to the species *L.lactis* and 58 strains had profiles assigned to the genus *Enterococcus*. Six strains had protein profiles that could not be assigned to the genus *Enterococcus* or the species *L.lactis*. The DNA of three of the latter was sequenced and identified as *L.lactis lactis*. The correlation between the identification of the strains and the SDS-PAGE profiles is good, particularly for *L.lactis*. Indeed, 95% of the strains with a *L.lactis* phenotypic profile had *L.lactis* SDS-PAGE protein profiles (profiles LI, II, III, IV and C1). For *Enterococcus* spp., the correlation was not as good: 70% of the strains with an *Enterococcus* spp. phenotypic profile were associated with *Enterococcus* spp SDS-PAGE protein profiles (profiles EI, II, III, IV, V and VI).

Genus, species and subspecies amplification of DNA

Genus and species specific PCR confirmed that *L.lactis* and *Enterococcus* spp. were the dominant lactic acid bacteria isolated from Elliker agar modified according Chamba *et al.* (1981). So, 73 strains were identified as *L.lactis lactis* (50% of strains tested), 17 strains as *L.lactis cremoris* (12%) and 56 strains as enterococci (38%).

REP-PCR

Figure 2 shows the profiles obtained from the 146 isolates. Four main groups can be distinguished: A, B, C and D. Profiles A and B were assigned to the species *E. faecalis* and *E. faecium*, profile C to *L.lactis lactis* and D to *L.lactis cremoris*. Contrary to the whole-cell protein profiles, it was possible to differentiate the REP-PCR profiles assigned to *Enterococcus faecalis* (profiles A2, B1) from those corresponding to *Enterococcus faecium* (profiles A1, B2) despite certain similarities between the 2 species (profiles B1, B2 and A1, A2).

Partial 16s rRna sequencing

51 strains representative of the diversity of the phenotypic, genotypic and protein profiles were classified genetically into 5 species by partial 16s rRNA sequencing (fig 3). The two main groups contain the genus *Enterococcus* (group II) divided into 2 sub-groups containing the species *E. faecalis* (II.1) and *E. faecium* (II.2) and the species *Lactococcus lactis* (group I) divided into two subspecies *L.lactis lactis* (I.1) and *L.lactis cremoris* (I.2).

Two strains did not belong to these groups and were identified as *Aerococcus viridans* and *Streptococcus parauberis*. The correlation between the results of the phenotypic tests, the PCR tests and the sequencing is reported in table 4.

From the phenotypic tests it is possible to predict the species *L.lactis* as 26 strains out of the 33 were identified as *L.lactis*. The 7 remaining strains had the phenotypic characteristics of enterococci (grow at 45°C, 6.5% salt, pH=9.6).

Similar results were also observed for the genus *Enterococcus*: 13 strains out of the 15 identified had an *Enterococcus* phenotype.

A good correlation between the results of the PCR and the DNA sequencing was observed for *Enterococcus* spp. and *L.lactis lactis* (Table 4). So, 13 strains out of 15 (87%) identified as enterococci by DNA sequencing were characterised as enterococci by PCR and 22 strains out of 25 (82%) identified as *L.lactis lactis* were also identified as such by PCR. However, the correlation is not as good concerning *L.lactis cremoris* as only 6 strains out of 9 (67%) identified as *L.lactis cremoris* were also identified as such by PCR.

Dominant species in milk and relationship with farming practices

Out of the 146 strains identified isolated from the medium modified according to Chamba *et al.* (1981), *L.lactis* was the dominant species (88 strains). The subspecies *L.lactis lactis* was the most common (65 strains) in comparison with *L.lactis cremoris* (23 strains). *Enterococcus faecalis* (28 strains) and *Enterococcus faecium* (28 strains) were the two species of *Enterococcus* isolated. Table 5 presents the distribution of the species according to the farms. A farm was removed from the analysis as only one isolate out of the five isolates could be cultured. When more than 2/3 of the strains identified from each of the farms belonged to the same species or genus, this species or genus was considered as dominant. E corresponds to *E. faecalis* and *E. faecium*, L to *L. lactis*. The distribution of the species varied according to the farms. Thirteen farms were characterized by the dominance of *L. lactis* and eight by a dominance of *Enterococcus*. For one farm (no. 37), the distribution between *L. lactis* and *Enterococcus* was similar; no dominant group was allocated. The groups of dominant species were significantly discriminated (p-value $\leq 5\%$) by certain farming practices (Table 6). Most of the farms putting hay in the bedding were associated with group E (6 farms among 8) and most farms with only straw on the bedding were associated with group L (10 farms among 12). The presence of *L. lactis cremoris* seems to be linked to the geographic area. Indeed, 3 farms out of the 4 in Franche-Comté

were characterised by a dominance of *L.lactis cremoris*, whilst in the other two regions, *L.lactis lactis* was largely dominant. Only one farm out of the 6 farms in the Pélardon PDO had milk in which the species *L.lactis cremoris* was dominant. No *L. lactis cremoris* were detected in the Rocamadour PDO area.

DISCUSSION

Lactococcus lactis, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are the three species most commonly isolated on Elliker medium modified according to Chamba *et al.* (1981), a medium specifically adapted to the growth of lactic acid bacteria. These species were identified using a combination of phenotypic and genotypic methods. Contrary to the results obtained by Delgado et Mayo. (2004) who were unable to distinguish the SDS-PAGE profiles of the subspecies of *L. lactis*, the species *L. lactis* as well as the subspecies *L. lactis* subsp *lactis* and *L. lactis* subsp *cremoris* were discriminated by the whole-cell protein profiles (SDS-PAGE). However, it was not possible to distinguish the profiles of species of *Enterococcus* using SDS-PAGE, whereas in a study on lactic acid bacteria in the dog intestine Kim and Adachi (2007) were able to discriminate the different species of *Enterococcus*. REP-PCR profiles enabled the *Enterococcus* species and the *L. lactis* subspecies studied to be discriminated correctly, as previously reported by Jurkovic *et al.* (2006) and Jan *et al.* (2007). Subspecies specific PCR using primers targeting the Histidine operon biosynthesis region carried out according to the protocol developed by Corroler *et al.* (1998) correctly discriminated *L lactis lactis* but seems to be less effective for *L. lactis cremoris* (3 false positives out of 9 strains in total).

For the species *L.lactis*, the phenotypes all corresponded to the species *L. lactis lactis*, no specific phenotype was associated with *L. lactis cremoris*. This result is not surprising as the strains of phenotype *L .lactis cremoris* are isolated in a dairy environment where lactic starters are regularly used in the manufacture of fermented products (Klijn *et al.*, 1995). The majority of *L. lactis* strains had a *L .lactis lactis* genotype (65 strains out of the 88 belonging to the species *L .lactis*). The 23 remaining strains corresponded to the genotype *L. lactis cremoris*. The dominance of *L .lactis* and *Enterococcus* in milk has already been underlined by numerous authors including Zamfir *et al.* (2006) in cows' milk and Badis *et al.* (2004a) in goats' milk. Certain strains from different farms belonging to the *L.lactis*

phenotype and genotype can grow in the presence of 6.5% salt and at pH 9.6. This result is not surprising as these environmental microorganisms undergo significant stress. These phenotypic particularities have already been underlined by Corroler *et al.* (1998) for strains isolated from cows' milk. More than 60% of the strains of *L.lactis* were also capable of growing at pH 9.2.

The distribution of the species in the milk depends on the farms. This farm-specific characteristic has already been underlined by Corroler *et al.* (1998) in cows' milk from Normandy. Certain farms are characterised by a dominance of *L. lactis lactis* (8 farms out of the 21 farms studied), others by *E. faecalis* (4 farms out of the 21) or *E. faecium* (4 farms out of the 21). The presence of a majority of *L. lactis* subsp *cremoris* in the milk (4 farms out of the 21) seems to depend on the geographic area as it is found preferentially on farms located in Franche-Comté. It is important to underline that the farms in Franche-Comté are equipped with bucket milking systems contrary to the other regions where milk is recovered via a milk line. The methods of cleaning and the materials being different, it can be assumed that the bacteria are transported in different ways (Laithier *et al.*, 2004).

The dominance of *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*) or *L.lactis* seems to be due in part to certain farm-specific characteristics. The direct contact between the milking parlour and the goat shed or the presence of hay in the bedding seems to promote inoculation of milk with *Enterococcus faecalis* or *Enterococcus faecium*. The natural habitat of *Enterococcus* is the intestines of humans and animals (Falcklam *et al.*, 2002). Kagkli *et al.* (2007) showed that a major source of *Enterococcus* in milk was the milking machine. However, these authors also brought to light the fact that certain strains of *Enterococcus* from dairy cow faeces were found on the teats. Cross-contamination from the faeces to the teat is therefore possible. So, bedding containing droppings can be a potential vector of *Enterococcus*. Concerning the relationship between the dominance of *Enterococcus* in milk and the presence of hay in the straw-based bedding, no scientific studies have been undertaken on this subject as far as we know. However, we can assume that the hay from fodder is less absorbent than straw, therefore favouring the development of bacteria on the surface of the bedding. This waste food may also be more contaminated as it is put in the troughs before being used for bedding.

These first results concerning the possible association between certain farming practices and the main bacteria isolated on Elliker medium modified according to Chamba *et al.* (1981) is worth confirming by analysing the sources of contamination of *Enterococcus* and *Lactococcus*, *L.lactis* in particular. Continuing this study in this direction would permit to

identify the farming operations that would enable a decrease in the contamination of *Enterococcus* and promote the development of *L.lactis* in milk. The technological and sensorial quality of lactic cheeses could therefore be improved.

This study was supported by the Midi-Pyrénées Conseil Régional and the association GALA (Janzé, France).

Acknowledgements: The authors would like to thank the technicians and farmers from the Pelardon, Rocamadour and Franche-Comté regions for their implication in this study.

References

- Bachmann, H.P., McNulty, D.A., McSweeney, P.L.H., Ruegg, M., 1996. Experimental designs for studying the influence of the raw milk flora on cheese characteristics : A review. *Journal Society Dairy Technology* 49, 53-56.
- Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B. M., Henni, D. E., KIHAL, M., 2004a. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* 21, 579-588.
- Baker, GC., Smith, JJ., Cowan, DA., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55, 541-555.
- Berthier, F., Beuvier, E., Dasen, A., Dufrene, F., Grappin, R., 2001. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers, *International Dairy Journal* 11, 293-305.
- Centeno, J.A., Menendez, S., Rodriguez-Otero, J.L., 1996. Main microflora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology* 33, 307-313.
- Chamba, J.F., Bonnaz, G., Bourg, P., 1981. Comparaison de diverses méthodes de dénombrement de la flore acidifiante du lait cru. *Lait* 61, 555-567.
- Corroler, D., Mangin I., Desmases, N., 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.
- Delgado, S., Mayo, B., 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 90, 309–319.

- Demarigny, Y., Sabatier, C., Laurent, N., Prestoz, S., Rigobello, V., Blachier, M.J., 2006. Microbial diversity in natural whey starters used to make traditional Rocamadour goat cheese and possible relationships with its bitterness. *Italian Journal of Food Science*, 18, 261-276.
- Duthoit, F., Tessier, L., Montel, M.C., 2005. Diversity, dynamics and activity of bacterial populations in 'Registered Designation of Origin Salers cheese by single-strand conformation polymorphism analysis of 16SrRNA genes. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1198-1208.
- Facklam, R., Carvalho, M.G., Teixeira, L., 2002. History, taxonomy, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In : Gilmore, M(Eds), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance*. ASM Press, Washington,DC(20036-2904).
- Fox, P.F., Wallace, J.M., Morgan, S., Lynch, C.M., Niland, E.J., Tobin, J., 1996. Acceleration of cheese ripening. *Antonie Leuvenhoek* 70, 271-297.
- Frahm, E., Heiber, I., Hoffmann, S., Koob, C., Meier, H., Ludwig, W., Amann, R., Schleifer, K.H., Obst, U., 1998. Application of 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control. *Systematic and Applied Microbiology* 21, 450-453.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., Gonzales Prieto, M.J., Tornadijo, M.E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goat's milk cheese). *International Dairy Journal* 13, 469-479.
- Jan, L., Rademaker, W., Herbet, H., Starrenburg, M, J.C., Naser, S M., Gevers D., Kelly, W J., Hugenholtz, J., Swings, J., Van Hycama Vlieg, J, E.T., 2007. Diversity Analysis of Dairy and Nondairy *Lactococcus lactis* Isolates, Using a Novel Multilocus Sequence Analysis Scheme and (GTG) 5-PCR Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7128-7137.

- Jurkovic, L., Krizkova, M., Sojka, A., Belicova, R., Dusinsky, J., Krajcovic, C., Snauwaert, S., Naser, P., Vandamme, M., Vancanneyt., 2006. Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *Journal of Genetic Applied Microbiology* 52, 329-337.
- Kagkli D.M, Vancanneyt M., Vandamme P., Hill C., Cogan T.M., 2007. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. *Journal of Applied Microbiology* 103,1393-1405.
- Kim, S-Y., Adachi, Y., 2007. Biological and genetic classification of canine intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Microbiology immunology* 51, 919-928.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H., De Vos, W.M., 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Appl Environ. Microbiol* 61, 788-792.
- Laithier, C., Chatelin, Y.M., Tormo, H., Lefrileux, Y., 2004. Biofilms in farms producing goat cheese: Localisation, nature and role on products quality. In: *Proceedings of the 11th Rencontres Recherche Ruminant Conference* 11, 112, Paris, France.
- Lynch, C.M., McSweeney, P.L.H., Fox P.F., Cogan T.M., Drinan, F.D., 1997. Contribution of starter lactococci and non lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait* 77, 441-459.
- Manopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., Anifantakis, E.M., 2003. Evolution of microbial population during traditional feta cheese manufacturing and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 82, 153-161.
- Mauriello, S., Moio, L., Moschetti, G., Piombino, P., Addeo, F., Coppola, S., 2001. Characterization of lactic acid bacteria strains on the basis of neutral volatile compounds produced in whey. *Journal of Applied Microbiology* 82, 153-161.
- Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J. F., 2001. Raw cowmilk microflora: diversity and influence of conditions of production. *Lait* 81, 575-592.

- Steele, J.L., Ünlü, G., 1992. Impact of lactic acid bacteria on cheese flavor development. *Food technology* 1992, 128-135.
- Tormo, H., Talliez, P., 2000. Contribution d'un levain naturel à la spécificité des fromages fermiers de chèvre (Natural starter contribution to the typicality of goat farm cheese). In: Gruner, L., Chabert, Y. (Eds), 7th International Conference on goats II, 583-585.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol* 24, 1596-1599.
- Tormo, H., Agabriel, C., Lopez, C., Ali Haimoud Lekhal, D., Roques, C., 2010. Relationship between the production conditions of goat's milk and the microbial profiles". *International Journal of Dairy Science*, In Press.
- Verdier Metz, I., Michel, V., Delbès, C., Montel, M-C., 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk ? *Food Microbiology* 26, 305-310.
- Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 6823-6831.
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., De Vuyst, L., 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 487-495.

Tables and figures

Table 1: Groups of variables describing the management practices) and number of farms per practice

Variable label	Level	Number of farms
1.General management		
Size of flock	116±83	21
Pasture in spring and summer	yes	18
	no	3
Level of production (Kg/goat/year)	639±196	21
Area	PDO Rocamadour	11
	PDO Pélardon	6
	Franche-Comté	4
2. Monitoring of flock		
Milk testing	No milk testing	9
	Milk testing	12
Monitoring of somatic cells	No monitoring of somatic cells	15
	Monitoring of somatic cells	6
Antiparasitic treatment	No antiparasitic treatment	4
	Antiparasitic treatment	17
Antibiotic treatment during drying off	No antibiotic treatment	10
	Antibiotic treatment	11
Homeopathic treatment during drying off	No homeopathic treatment	10
	Homeopathic treatment	11
3. Bedding management practices		

Variable label	Level	Number of farms
Bedding	straw	15
	straw + hay	6
Additive in the bedding	yes	10
	no	28
4. Environmental conditions during and after milking		
Mulching during milking	yes	4
	no	17
Frequency of cleaning milking platform	frequently: after each milking	11
	not frequently: less frequently than after each milking	10
Position of milking parlour	no separation with the bedding area	3
	physical separation with the bedding area	18
Method of cleaning milking platform	dry method	17
	with water	4
5. Practices concerning the teats		
Disposal of premilking	yes	16
	no	5
Desinfecting of teats after milking	yes	3
	no	18
5. Cleaning of milking machine		
Maximal temperature (°C)of cleaning of milking machine	60,5±12	21
Intercleaning with alkaline and acid products	frequently: change of product every day	13
	not frequently: change less	8

Variable label	Level	Number of farms
	frequently than every day	
Residue of water in the MM	yes	13
	no	8
Washable sanitary trap	yes	5
	no	16
6.Handling and characteristics of the MM		
Lengh of pipeline	< 120 m	15
	≥ 120 m	6
Number of elbows and fittings	< 4	9
	≥ 4	12

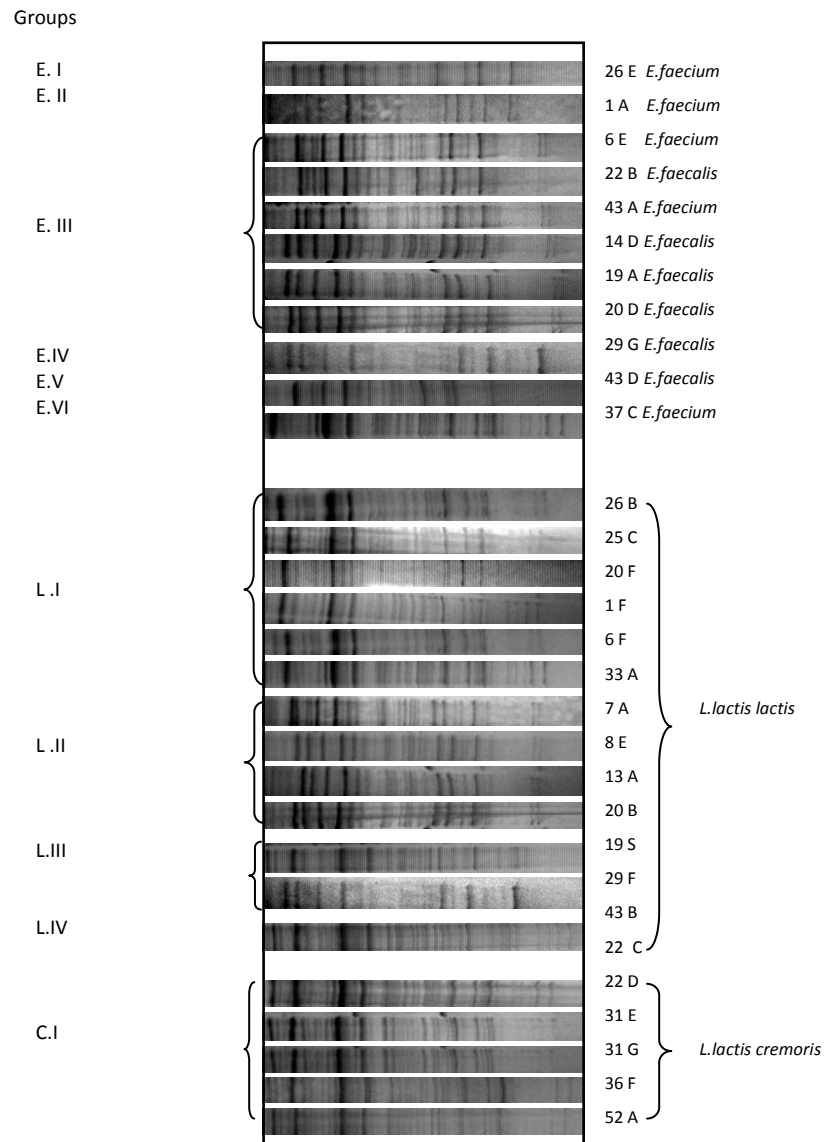


Fig 1: SDS- PAGE patterns of cell wall proteins from sequenced isolates. The numbers followed by letters to the right of the figure are the codes of the strains analysed. The number corresponds to the farm, the letter to the clone isolated.

REP-PCR Profiles

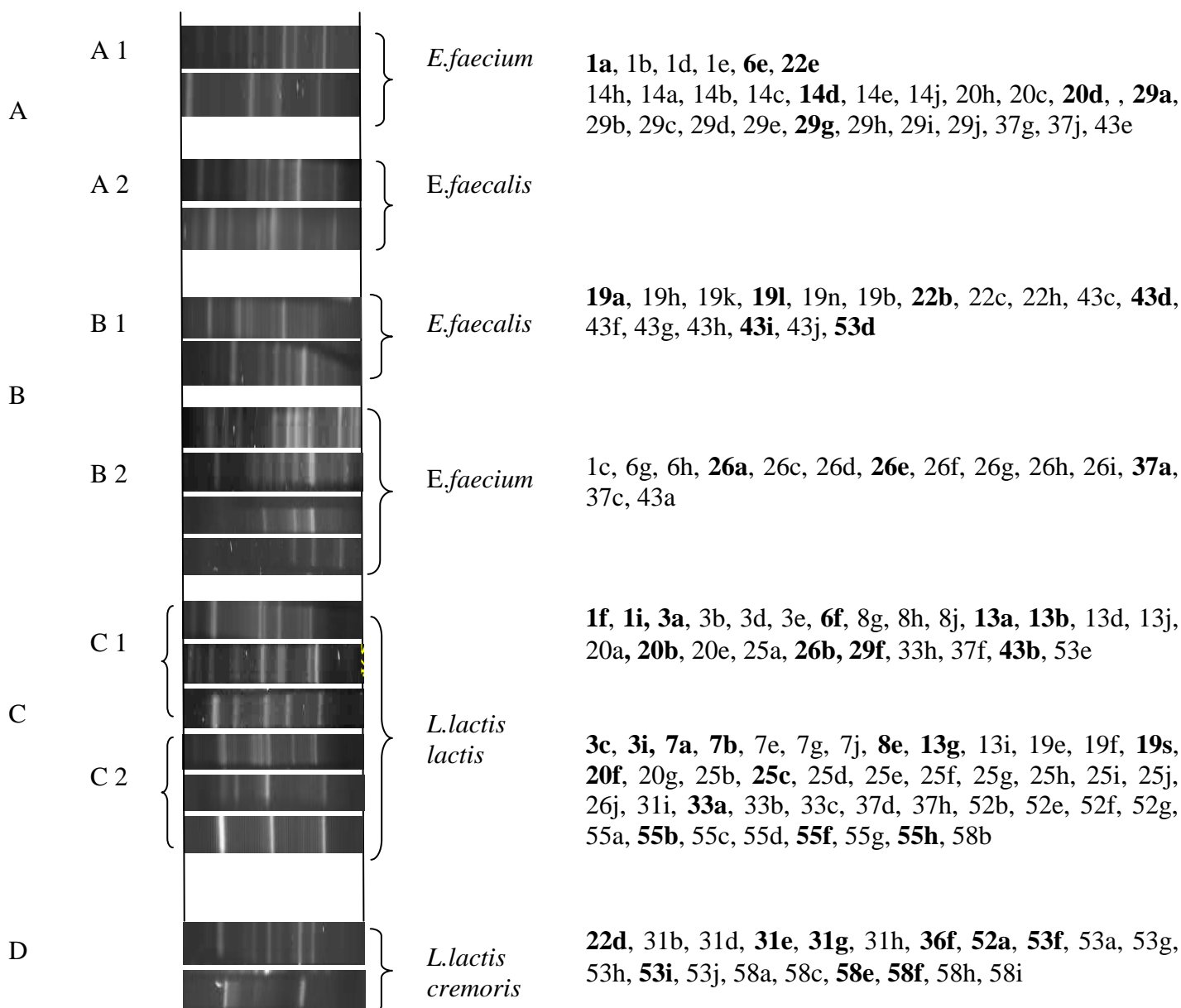


Fig 2: Rep-PCR patterns showing the representative fingerprints of the different clusters. The numbers followed by letters to the right of the figure are the codes of the strains analysed. The number corresponds to the farm, the letter to the clone isolated. The numbers in bold represent the sequenced isolates.

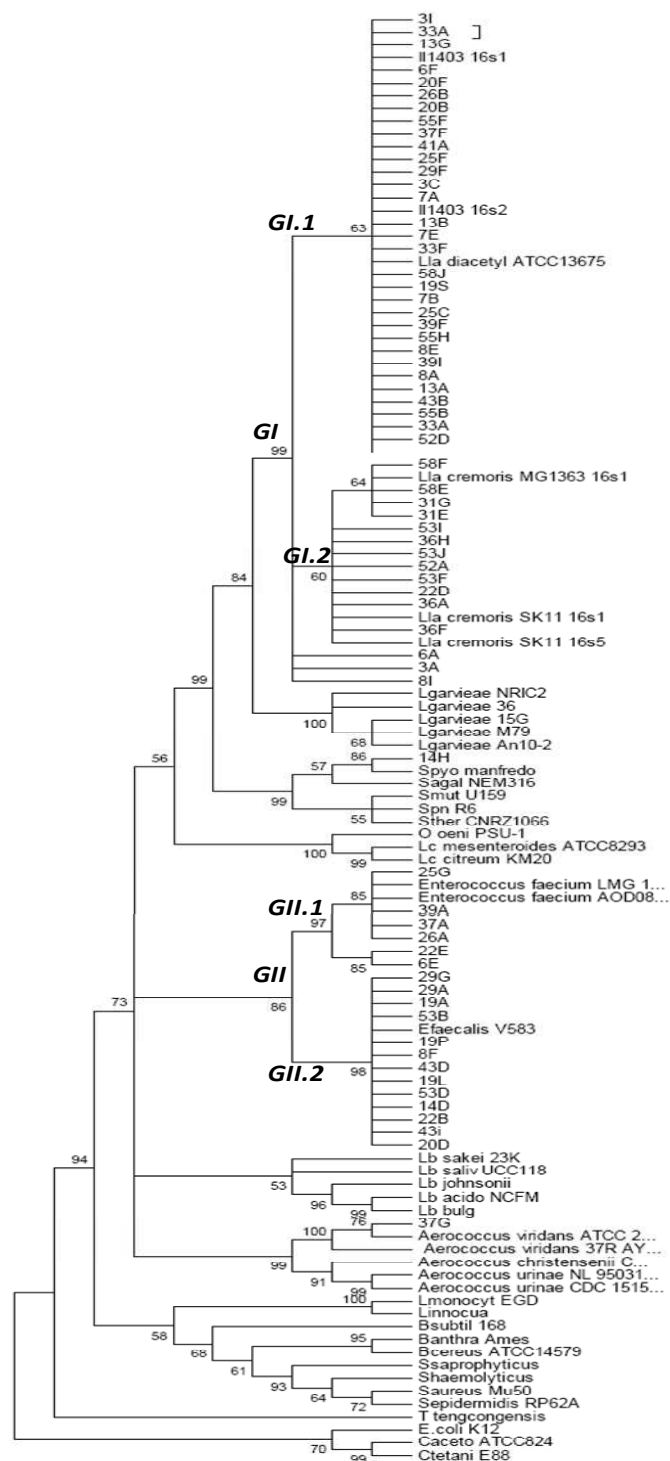


Fig 3: Phylogenetic tree of the strains isolated from goat milk and the reference strains obtained by the Neighbour-Joining (bootstrap 1000). Goat milk strains' codification : Number, letter (ex : 3A).

Table 2: Primer sequences, amplification and application of PCR reactions

Primer sequences	Amplification conditions	Application
<p>His1: 5'-CTTCGTTATGATTTTACA -3'</p> <p>His2: 5'- AATATCAACAATTCCATG-3'</p> <p>Conrev 23:</p> <p>5'- GGTGGATGCCTTGGCACT -3'</p> <p>Genter: 5'-CTCTACCTCCATCATTCT-3'</p> <p>REP1R-Dt:</p> <p>5'-IIINCGNCGNCATCNGGC-3'</p> <p>REP2-D: 5'-NCGNTTATCNGGCCTAC-3'</p> <p>E8F:</p> <p>5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'</p> <p>E807R:</p> <p>5'TGGACTACCAGGGTATCTAATC-3'</p>	<p>5 min at 94°C, 30 cycles of: 1 min 94°C, 2 min at 45°C, 2 min at 72°C, final step 5 min at 72°C</p> <p>5 min at 94°C, 30 cycles of: 30 sec 94°C, 30 sec at 52°C, 30 sec at 72°C, final step at 5 min at 72°C</p> <p>5min at 94°C, 30 cycles of: 1 min at 94°C, 1 min at 40°C, 6min ramping to 72°C and 1 min at 72°C</p> <p>3 min at 94°C, 30 cycles of: 45 sec 94°C, 2 min at 55°C, 1min at 72°C, final step 5 min at 72°C</p>	<p>Detection of <i>Lactococcus lactis lactis</i> and <i>Lactococcus lactis cremoris</i></p> <p>Detection of the genus <i>Enterococcus</i></p> <p>PCR fingerprinting</p> <p>Amplification of the V1-V4 region of 16s rDNA</p> <p>The primer used for the sequencing was E8F</p>

Table 3: Phenotypic characteristics of strains isolated from milk samples

Clusters	number of strains	number of farms	Growth with 4 % salt	Growth with 6.5% salt	Growth at pH 9.2	Growth at pH 9.6	Growth at 40°C	Growth at 45°C	Coagulation of litmus milk	NH3 from arginine	Maltose	Ribose	Phenotype
A	13	5	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	<i>Enterococcus</i> spp.
B	84	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Enterococcus</i> spp.
C	12	6	+	-	9/3	-	-	-	+	-	10/2	+	<i>Lactococcus Lactis</i>
D	28	10	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	<i>Lactococcus Lactis</i>
E	30	11	+	+	+	17/13	+	-	+	+	+	+	<i>Lactococcus Lactis</i>
F	37	17	+	-	+	11/26	+	-	+	+	+	-	<i>Lactis</i>

Table 4 : Correlation between the sequencing results of the 16s rDNA V1-V4 region and the results of the phenotypic tests and PCR. The numbers correspond to the number of strains.

	Number of strains sequenced	Sequencing				
		<i>L.lactis lactis</i>	<i>L.lactis cremoris</i>	<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Aerococcus viridans</i>	<i>Streptococcus parauberis</i>
		25	9	15	1	1
Analyses	Typology					
Phenotype	<i>L.lactis lactis</i>	14	8	2	1	0
	<i>L.lactis cremoris</i>	3	0	0	0	1
	<i>Enterococcus spp.</i>	7	1	13	0	0
	n.i	1	0	0		
PCR	<i>L.lactis lactis</i>	19	1	2	1	1
	<i>L.lactis cremoris</i>	3	6	0	0	0
	<i>Enterococcus spp.</i>	2	2	13	0	0

Chapitre V – Caractérisation phénotypique et géotypique des bactéries lactiques isolées de lait de chèvre et influence des caractéristiques d'élevage sur les espèces dominantes

Table 5: Distribution of number of strains per farm identified as being *L.lactis* or *Enterococcus* and allocation to a dominant group

No. Farms	Region	<i>L.lactis</i> <i>lactis</i>	<i>L.lactis</i> <i>cremoris</i>	<i>L.lactis</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus</i> spp	otherspecies	nT ¹	%lactis	Groups ³
1	PDO Rocamadour	2	-	2	-	5	5	-	7	29	E
3	PDO Rocamadour	6	-	6	-	-	0	-	6	100	L
6	PDO Rocamadour	1	-	1	-	3	3	-	4	25	E
7	PDO Rocamadour	5	-	5	-	-	0	-	5	100	L
8	PDO Rocamadour	4	-	4	-	-	0	-	4	100	L
13	PDO Rocamadour	6	-	6	-	-	0	-	6	100	L
14	PDO Rocamadour	-	-	0	6	-	6	<i>S.parauberis</i>	7	0	E
19	PDO Rocamadour	3	-	3	6	-	6	-	9	33	E
20	PDO Rocamadour	6	-	6	2	-	2	-	8	75	L
22	PDO Rocamadour	1	-	1	4	-	4	-	5	20	E
25	PDO Rocamadour	10	-	10	-	-	0	-	10	100	L
26	PDO Pélardon	2	-	2	-	8	8	-	10	20	E
29	PDO Pélardon	1	-	1	-	9	9	-	10	10	E
31	PDO Pélardon	1	6	7	-	-	0	-	7	100	L
33	PDO Pélardon	4	-	4	-	-	0	-	4	100	L
37	PDO Pélardon	3	-	3	-	3	3	<i>A. viridans</i>	7	43	-
43	PDO Pélardon	1	-	1	9	-	9	-	10	10	E
52	Franche-Comté	-	5	5	-	-	0	-	5	100	L

Chapitre V – Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées de lait de chèvre et influence des caractéristiques d'élevage sur les espèces dominantes

No.	Region	<i>L.lactis</i> <i>lactis</i>	<i>L.lactis</i> <i>cremoris</i>	<i>L.lactis</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus</i> spp	otherspecies	nT ¹	%lactis	Groups ³
53	Franche-Comté	1	6	7	1	-	1	-	8	88	L
55	Franche-Comté	7	-	7	-	-	0	-	7	100	L
58	Franche-Comté	1	6	7	-	-	0	-	7	100	L
Total		65	23	88	28	28	56		146		

¹ : number of strains belonging to the species or subspecies identified 2 : total number of strains 3 : Dominant species group. E: *Enterococcus* dominant, L: *L.lactis* dominant.

Table 6: Farming practices discriminating the dominant groups of species

Practices	Number of farms per practice	Number of farms according to groups of dominant specie		P value (%)
		E (n ¹ =8)	L (n ¹ =12)	
Addition of reject hay in straw-based bedding	8	6	2	1,5
No addition of reject hay in straw base bedding	12	2	10	

¹ : total number of farms per group of dominant species

CHAPITRE VI
DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

En ce qui concerne les flores microbiennes dénombrées, le faible niveau des microflore totales (Flore Mésophile Aérobie Revivifiable) dans les laits crus de chèvre ($3,6 \log_{10}$ ufc.ml⁻¹ en moyenne) constaté dans notre étude est similaire aux résultats d'études réalisées en France sur les dix dernières années en lait de chèvre (Casalta *et al.*, 2009) et lait de vache (Michel *et al.*, 2001 ; Bouton *et al.*, 2005 ; Desmasures *et al.*, 2010). Par contre, ce niveau est très variable d'un pays à un autre. Cette variabilité peut être attribuée aux conditions de production et aux conditions climatiques qui diffèrent selon les régions. La dominance des staphylocoques à coagulase négative corrobore les résultats d'études antérieures menées en lait de chèvre (Valle *et al.*, 1991 ; Kyozaire *et al.*, 2005). Parmi les microflore dénombrées sous-dominantes, les bactéries lactiques mésophiles ainsi que les microcoques et corynébactéries, microflore considérées comme ayant un intérêt technologique en transformation fromagère sont détectées dans la majorité des laits et des élevages suivis. *L. lactis*, et *Enterococcus* spp. sont les plus fréquemment détectées. *Leuconostoc* spp. a été isolé très fréquemment du milieu MRS additionné de 0.1% de vancomycine. Par contre, il n'est pas détecté avec la méthode TTGE/DGGE. Les lactobacilles du groupe II peuvent être retrouvés approximativement au même niveau que les entérocoques mais ils sont moins fréquemment détectés dans les laits, ce qui dénote une variabilité plus importante d'un élevage à l'autre. Ils ne sont pas détectés comme microflore majoritaire lorsque l'on utilise la méthode TTGE/DGGE. Cette dernière méthode permet de mettre en évidence les espèces majoritaires (détection d'une espèce à partir de 1% d'ADN par rapport aux ADN bactériens totaux), il est probable que la quantité d'ADN des *Leuconostocs* et des lactobacilles du groupe II se situe en dessous du seuil de détection de la méthode si l'on considère qu'ils sont normalement bien différenciés par cette méthode. Peu d'études portant sur les bactéries lactiques des laits crus de chèvre ont été menées, si bien qu'il est difficile de comparer nos résultats à ceux de la littérature. On peut toutefois citer deux études menées en Algérie (Badis *et al.*, 2004 a,b ; Cheriguene *et al.*, 2007) où l'identification des bactéries lactiques a été réalisée à partir d'isolement sur milieu de culture. Pour ces deux études, les lactocoques (*L. lactis* subsp *lactis*), ainsi que les lactobacilles des groupes I (*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*), II (*L. plantarum*) et III (*L. brevis*), font partie des bactéries lactiques les plus fréquemment isolées. Les résultats divergent pour d'autres espèces de bactéries lactiques. Dans les travaux menés par Cheriguene *et al.* (2007), *E. faecalis* et *E. faecium* sont dominants. Pour Badis *et al.* (2004) ce sont *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus helveticus* qui dominent.

Dans notre étude, l'identification des espèces de bactéries lactiques thermophiles n'a pas été réalisée car ces espèces ne se développent pas en technologie lactique (température de coagulation et d'égouttage aux alentours de 20°C, trop faibles pour leur croissance). La divergence de nos résultats avec ceux de Badis *et al.*, 2004 et Cheriguene *et al.*, 2007, peut être expliquée par des conditions climatiques et de productions différentes. Si l'on compare nos résultats à ceux obtenus sur lait de vache, on observe la même tendance : *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* spp. et *Leuconostoc* spp. sont les bactéries lactiques les plus fréquemment rencontrées (Zamfir *et al.*, 2006, Giannino *et al.*, 2009 a,b). Concernant les microcoques et les corynébactéries, nos résultats corroborent ceux d'études antérieures menées sur quelques laits crus de chèvre (Tornadijo *et al.*, 1996 ; Callon *et al.*, 2007). Dans ce groupe, *Arthrobacter* spp. est détecté le plus fréquemment dans les laits (40%), ce qui va dans le sens des travaux menés par Callon *et al.* (2007) qui a suivi la dynamique des espèces bactériennes de laits de chèvre issue d'une exploitation. *Brevibacterium linens* est également détectée dans les laits crus de chèvre mais à une fréquence moindre (16% des laits). Cette espèce est également retrouvée dans des laits de vache (Verdier-Metz *et al.*, 2009) : 90% des laits issus de 67 exploitations en contiennent. Aucune étude n'a fait état, à notre connaissance, de la présence de ce germe dans les laits crus de chèvre.

En ce qui concerne les coliformes, leur niveau dépend très fortement de la saison. Au printemps (2006), les niveaux sont similaires à ceux des bactéries lactiques et des microcoques et corynébactéries. En hiver (2007), ils sont détectés dans seulement 13% des laits et à des niveaux très faibles (moins de 100 ufc.ml⁻¹).

L'influence de la saison sur les niveaux de coliformes dans les laits de vache, plus élevés en période chaude, a été démontré dans quelques études (Aleksieva et Krushev., 1981 ; Raynaud *et al.*, 2005). Ce niveau, plus élevé en période chaude, peut être attribué à une colonisation plus importante des supports de la machine à traire par ces germes, comme cela a été montré par Falkenberg *et al.* (2006) ou par une prolifération plus importante dans les litières après déjection (Rendos *et al.*, 1975).

Dans notre étude, le genre le plus fréquemment isolé des laits au printemps est *Serratia*, corroborant des travaux antérieurs sur lait de vache (Saubusse *et al.*, 2007 ; Ercolini *et al.*, 2009 ; Giannino *et al.*, 2009 a,b).

Les autres groupes de microorganismes (*Pseudomonas* spp., staphylocoques à coagulase positive, levures et moisissures) sont retrouvés à des niveaux très faibles pour les deux saisons (moins de 100 ufc.ml⁻¹ pour 75% des laits). Ces résultats vont dans le sens des

travaux menés sur lait de vache (Bouton *et al.*, 2005 ; Michel *et al.*, 2005 ; Raynaud *et al.*, 2005).

Effet de la zone géographique sur les niveaux de flores microbiennes et la répartition des espèces et sous-espèces

Nous n'avons pas mis en évidence d'effet significatif de la zone géographique sur les niveaux des flores microbiennes. Par contre, la sous espèce *L.lactis cremoris* est largement dominante dans les exploitations issues de Franche-Comté alors que pour les deux autres zones géographiques (AOP Rocamadour et Pélardon), la sous-espèce lactis est largement dominante. Le type d'équipement de la machine à traire (pots trayeurs pour les élevages issus de Franche-Comté, lactoduc pour les deux autres zones) peut être à l'origine de ses différences. En effet, l'équipement influence les conditions de nettoyage de la machine à traire et par conséquent la nature des biofilms en surface du matériel. Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse par une analyse comparative des biofilms en surface de ces deux équipements (pots trayeurs, lactoducs) dans des élevages d'une même zone géographique et pour lesquels les autres conditions d'élevage sont similaires.

Effet de la saison sur les niveaux des microflores des laits crus de chèvre

Les niveaux des microflores sont significativement plus bas en hiver qu'au printemps, excepté pour les staphylocoques à coagulase négative. Une même tendance a été rapportée dans des travaux portant sur des laits de petits ruminants (Kalagriou-Vassiliadou *et al.*, 1991 ; Salmeron *et al.*, 2002) mais également sur laits de vache (Bouton *et al.*, 2005 ; Michel *et al.*, 2005 ; Raynaud *et al.*, 2005).

La saison superpose l'effet du cycle temporel avec les variations extrinsèques des températures et des durées de jour, ainsi que l'effet du stade de lactation. Cependant, les conditions d'élevage dont l'exhaustivité est difficile à saisir, peuvent également être différentes, conduisant à rendre difficile la distinction des impacts respectifs de la saison et des conditions d'élevage.

Effet des conditions d'élevage sur la composition des microflores des laits crus

Les conditions d'élevage associées aux niveaux des microflores des laits dépendent en partie de la saison, mais globalement la tendance est la même : Les pratiques d'élevage qui tendent à limiter le niveau de microorganismes dans l'environnement proche du lait de traite (aire de couchage des animaux, hygiène de la traite) sont associées à de faibles niveaux de microflores des laits et en particulier à ceux des bactéries lactiques.

Dans les exploitations qui ont des profils de microflores identiques pour les deux saisons étudiées, la nature de la litière ainsi que la température initiale de nettoyage de la machine à traire sont les deux facteurs qui discriminent significativement ($p < 0.05$) les niveaux de microflores. Ainsi, le groupe de profil dont les niveaux des microflores sont en moyenne 30 à 100 fois plus élevés est associé à des litières où l'on ajoute des refus de foin. Nos travaux ont montré que le type de litière conditionne également les espèces dominantes de bactéries lactiques acidifiantes isolées du milieu Elliker selon Chamba *et al.* (1981). En effet, la proportion d'entérocoques est nettement plus importante pour les élevages mettant du refus de foin dans les aires paillées (80% des souches sont des entérocoques contre 20% avec des aires paillées sans refus de foin). Il n'existe à notre connaissance pas de travaux scientifiques portant sur la comparaison des niveaux d'entérocoques dans les litières à base de refus de foin et celles composées de paille uniquement. Par contre, Bouton *et al.* (2005) ont montré que l'utilisation de foin, et notamment la présence de foin dans les litières, est associée à des teneurs plus élevées des laits crus en lactobacilles hétéro fermentaires.

Kakgli *et al.* (2007) ont montré que la source majeure des entérocoques dans le lait était la machine à traire. Cependant, ces mêmes auteurs ont mis en évidence que certaines souches d'entérocoques provenant des fèces de vaches laitières se retrouvaient sur les trayons. On peut donc supposer que des litières contenant des excréments peuvent être vecteurs potentiels d'entérocoques. On peut également supposer que les refus de foin sont moins absorbants que la paille, le développement bactérien en surface des litières pourrait être favorisé. Ces refus de foin peuvent être également plus contaminés car ils sont mis dans les auges comme aliments pour les chèvres avant leur utilisation comme litière, contrairement à la paille pour laquelle il n'y a pas d'utilisation préalable.

Concernant l'aire de couchage des animaux, la nature des litières n'est pas la seule pratique en lien avec les profils microbiens des laits. Au printemps, la fréquence de

renouvellement des litières discrimine également les profils microbiens les plus opposés. Les profils avec les plus faibles niveaux de microflore sont associés à des fréquences de curage importantes (plus de trois curages par an avec une densité animale faible, supérieure à 2.5m² par chèvre) et ceux à forts niveaux de microflore sont associés à des fréquences de curage plus faibles (en moyenne 1 à 2 curages par an avec une densité animale plus élevée, inférieure à 2.5 m² par chèvre). En hiver, cette tendance n'est pas observée. Il est fortement probable que cela soit dû au renouvellement des litières effectués pour l'ensemble des troupeaux après les mises bas effectuées environ 1 mois avant les prélèvements des laits. Ces résultats concernant l'entretien des litières vont dans le sens des travaux menés par Ménard *et al.*(2004) qui a montré qu'un paillage bi-quotidien est à privilégier pour limiter le développement des microflore d'altérations dont les entérocoques.

L'ambiance autour de la traite semble être également un élément influençant les microflore majoritaires rencontrées dans les laits. En effet, lorsque les conditions d'hygiène sont respectées (machine à traire propre, mamelles saines), le risque moyen de détecter des *L. lactis* dans les laits est environ 4 fois plus important lorsque la salle de traite est en contact direct avec la chèvrerie (résultats obtenus par la méthode TTGE/DGGE). Ces résultats montrent que l'ambiance autour de la traite peut influencer les équilibres microbiens et véhiculer des bactéries lactiques. Dans de bonnes conditions d'hygiène, ce sont les *L. lactis* qui seraient favorisés. Ce constat va dans le sens des travaux menés par Klijn *et al.*(1995) qui ont montré que *L. lactis* se retrouvait fréquemment dans les environnements d'élevages laitiers (mamelles et peaux des bovins, salives, sols à l'entour des bâtiments d'élevages laitiers, aliments concentrés, ensilages et herbes fraîches). Le fourrage dans les litières pourrait être également une source d'ensemencement en bactéries lactiques comme cela a été démontré pour certains lactobacilles (Bouton *et al.*, 2005). Ainsi, lors de la traite, un contact permanent avec la chèvrerie tend à favoriser l'ensemencement des laits en *L. lactis*.

L'environnement des animaux semble également avoir une influence sur la présence de *B. linens* dans les laits. Le risque moyen de détecter cette espèce est 6,7 fois plus élevé lorsque les troupeaux sont en chèvrerie en permanence par rapport aux troupeaux pâturants. *B. linens* est une espèce largement présente dans la nature. On la retrouve dans des milieux très différents : les sols (Crombach, 1974), les litières (Schefferle, 1966., Mohan, 1981), les plantes (Keddie et Leask et Grainger, 1966., Owens et Keddie, 1969), la peau (Pitcher et Noble, 1978) et les produits laitiers (Abd-El-Malek et

Gibson, 1952., Jayne-Williams et Skerman, 1966). L'ambiance plus confinée de la chèvrerie favorisant le développement des microflores, le contact permanent des chèvres avec les litières, les aérosols contenant en partie les microflores des litières et des animaux et le caractère ubiquitaire de cette espèce, pourraient expliquer une détection plus fréquente de *B. linens*.

L'état sanitaire du troupeau influencerait également les équilibres microbiens du lait. Lorsque l'état sanitaire du troupeau est médiocre (état des trayons et suivi sanitaire du troupeau), le risque de détecter *S. fonticola* ou *S. marcescens* est plus important. *S. marcescens* est un pathogène opportuniste d'origine environnementale, parfois impliqué dans les mammites subcliniques des petits ruminants (Todhunter *et al.*, 1991 ; Bergonnier *et al.*, 2003). Il est donc probable que leur présence dans les laits soit en partie due à leur implantation sur des trayons non sains (indurations, abcès ...) ou à des mammites subcliniques. L'absence de suivi du troupeau par le contrôle laitier augmente le risque de présence des staphylocoques. Les staphylocoques font partie de la flore cutanée normale des animaux et des humains. Ce sont les germes les plus fréquemment impliqués dans les mammites sub-cliniques des chèvres (Bergonnier *et al.*, 2003).

En ce qui concerne les conditions de traite, l'hygiène à la traite influencerait les niveaux des flores microbiennes et les équilibres entre espèces bactériennes. La température de nettoyage de la machine à traire (températures en début et en fin de traite) est un facteur qui discrimine les niveaux de microflores et en particulier les niveaux d'entérocoques pour les deux saisons suivies dans les élevages ou les profils microbiens sont stables d'une saison à l'autre, et pour l'ensemble des élevages pour l'hiver. Lorsque ces températures sont faibles (température initiale inférieure ou égale à 55°C, température finale inférieure ou égale à 40°C), les niveaux d'entérocoques sont significativement plus élevés (environ 10 fois plus d'entérocoques). D'autre part, les espèces *E. faecalis* et *E. faecium* sont plus fréquemment détectées lorsque le trayeur ne se lave pas les mains. Les entérocoques étant des hôtes normaux des animaux à sang chaud, plantes et insectes (Facklam *et al.*, 2002), il est logique de les retrouver fréquemment lorsque les conditions d'hygiène sont médiocres. Kakgli *et al.* (2007) ont montré que la majorité des lactobacilles et des entérocoques isolés dans l'environnement d'élevage laitier proviennent de la machine à traire et du tank à lait. On peut donc faire l'hypothèse que, lorsque les températures de nettoyage de la machine à traire sont faibles, le nettoyage est moins efficace et favorise donc l'installation de flores bactériennes, entérocoques en particulier.

Limite des résultats obtenus et perspectives de travaux futurs

Evaluer de manière exhaustive les flores microbiennes des laits crus de chèvre avec les moyens actuels est quasi impossible. Les méthodes actuelles permettent d'évaluer les flores microbiennes dominantes des laits crus et présentent des avantages et des inconvénients. Les méthodes cultures dépendantes permettent d'évaluer la flore microbienne cultivable. L'information obtenue par cultures et dénombrements sur milieux plus ou moins spécifiques se limite à la quantification d'un groupe de microorganismes ou d'un genre donné et parfois d'une espèce (cas des bactéries pathogènes par exemple). Pour approfondir la description des communautés microbiennes, les dénombrements peuvent être complétés par une caractérisation phénotypique et moléculaire des isolats. Cette caractérisation est partielle car le nombre de colonies prélevées n'est qu'un échantillon de l'ensemble des colonies présentes sur la boîte. Cette approche a été réalisée dans notre étude pour la caractérisation des bactéries lactiques.

La méthode culture indépendante utilisée dans ce travail (TTGE/DGGE) présente l'avantage de prendre en compte la globalité de communautés complexes et de permettre l'analyse simultanée de nombreux échantillons. C'est une méthode qualitative qui présente aussi ces limites : co-élution de plusieurs espèces qui amènent à sous estimer la diversité, détection des populations dominantes qui s'amplifient préférentiellement. Cette sous estimation des populations bactériennes peut expliquer en partie la non détection des *Leuconostocs* spp et des lactobacilles dans notre étude.

Les deux approches (culture dépendante et indépendante) donnant des informations complémentaires, certes partielles, ont donc été adoptées pour mener ce travail. L'influence des conditions d'élevage sur les niveaux de flores microbiennes et sur les espèces majoritaires des laits a été mise en évidence. L'approche exploratoire, menée en conditions réelles, permet d'émettre des hypothèses fortes quant aux facteurs influençant les caractéristiques microbiennes des laits.

La finalité de ce travail est de préconiser des pratiques d'élevage qui favorisent l'implantation, dans les laits, de flores microbiennes d'intérêt en technologie fromagère, et en particulier *L. lactis*. Ce dernier contribue, d'une part, à l'acidification du lait et du caillé, et d'autre part, aux caractéristiques sensorielles des fromages.

La nature des litières et l'environnement autour de la traite, puis le nettoyage de la machine à traire semblent être des points importants dans l'ensemencement des laits en

L.lactis. Il reste à vérifier s'ils sont des foyers de *L. lactis* et si un changement de l'environnement (par changement d'une pratique) modifie la composition microbienne des foyers et du lait.

Pour aller dans ce sens, un premier travail a été mené en partenariat avec l'équipe "génétique des bactéries lactiques" du laboratoire de Microbiologie et Génétique Microbienne (UMR5100), Toulouse. Un des objectifs de cette étude (confidentielle) était d'analyser la diversité génomique au sein de la sous espèce *Lactococcus lactis* subsp.*lactis* par analyse MLST (MultiLocus Sequence Typing) de souches issues des laits d'exploitations et de souches provenant de productions laitières industrielles. Il s'agissait également de caractériser les liens de parenté entre les différents isolats (dont des isolats environnementaux) issus d'exploitations. Cette technique de typage moléculaire, rapide et discriminante, est basée sur l'étude du polymorphisme de fragments internes de 6 ou 7 loci, d'environ 500pb. Elle permet d'attribuer un profil allélique ou séquence type, sorte de code barre propre à chaque isolat. L'analyse de ces séquences permet ensuite de caractériser les liens entre les isolats et de déterminer l'histoire évolutive de cette population (Feil, 2004).

L'analyse MLST de la sous espèce *lactis* met en évidence deux sous-populations bien distinctes, représentant chacune un écotype : une première formée de souches laitières assez proches génétiquement, une seconde formée de souches environnementales présentant une grande diversité génétique. Le manque de diversité observé chez les souches issues de productions laitières industrielles suggère alors une sélection de celles-ci pour une adaptation à des procédés technologiques (aptitudes acidifiantes et aromatisantes, sensibilité moindre aux phages,...). L'apport de nouvelles souches issues de laits provenant d'exploitations fermières à cette analyse confirme cette hypothèse. En effet, la plupart de ces souches sont regroupées avec les souches environnementales et présentent donc une grande diversité, aussi importante que les souches environnementales. Elles pourraient, en fait, provenir des végétaux (fourrages, litières, aliments...) et parviendraient à se maintenir dans le lait.

Pour vérifier cette hypothèse, une étude de traçabilité pourrait être réalisée. Elle permettrait de suivre la population de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* depuis la prairie ou le parcours jusqu'au lait. La poursuite de ce travail se fera donc dans ce sens. La détermination de la diversité génétique des souches de *L. lactis* isolées de différents biotopes (fourrages, surface des trayons, biofilms de la machine à traire) sera réalisée par analyse MLST. L'analyse des caractéristiques génomique (taille du chromosome, contenu plasmidique) se fera par électrophorèse en champs pulsés (PFGE) et/ou cartographie haute résolution

(optical mapping) d'un panel de souches sélectionnées sur la base des résultats MLST. Des marqueurs génétiques (régions chromosomiques variables) spécifiques de ces souches seront recherchés. Cette étude constituera une première caractérisation génotypique des souches environnementales capables de s'implanter dans les laits crus. Les aptitudes technologiques des souches d'origine environnementale seront également mesurées (aptitudes acidifiantes, production de diacétyle).

Ce projet, financé par le Conseil régional de Midi-Pyrénées, est mené par l'équipe "génétique des bactéries lactiques" du laboratoire de Microbiologie et Génétique Microbienne (UMR5100) de l'université de Toulouse et le laboratoire de Microbiologie de l'École d'Ingénieurs de Purpan. En fonction des résultats obtenus, il serait intéressant de poursuivre l'analyse des flux de *L. lactis* environnementaux depuis le lait jusqu'au fromage en adoptant la même approche. Il sera alors possible de vérifier l'implantation de ces souches environnementales dans le produit fini.

Lorsque les foyers de *L. lactis* seront identifiés et après vérification de l'implantation des souches environnementales dans le lait, il s'agira dans un deuxième temps d'évaluer l'impact des pratiques appliquées par l'éleveur sur ces foyers. Cet aspect pourra être abordé en sélectionnant quelques élevages pour lesquels les niveaux globaux de flores microbiennes sont faibles, notamment *L. lactis*. Dans ces élevages, des pratiques favorisant l'implantation de *L. lactis* seront testées. Ces pratiques seront sélectionnées à partir des résultats de cette thèse, et cibleront les principaux foyers de *L. lactis*. Un suivi des autres groupes microbiens (flores bactériennes d'intérêt technologique, pathogènes et d'altération) sera réalisé conjointement ; un changement de pratiques pouvant engendrer un changement d'équilibre bactérien.

Ainsi, l'identification des principaux foyers de *L. lactis* et la connaissance des pratiques favorisant l'implantation de cette espèce devront nous permettre, à terme, de faire des préconisations concrètes aux éleveurs pour l'amélioration de la qualité technologique de leur lait.

Enfin, il serait intéressant de mener ce même type d'approche sur d'autres espèces microbiennes détectées dans notre étude qui pourraient avoir un impact sur les caractéristiques sensorielles des fromages type lactique (*Staphylococcus spp*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *B. linens*...).

Valorisation du travail de thèse

ARTICLES

Tormo, H., Agabriel, C., Lopez, C., Ali Haimoud Lekhal, D., Roques, C., 2010. Relationship between the production conditions of goat's milk and the microbial profiles of milk. *International Journal of Dairy Science* (sous presse).

Tormo, H., Delacroix-Buchet, A., Lopez, C., Ali Haimoud Lekhal, D., Roques, C. Farm management practices and diversity of the dominant bacterial species in raw goat's milk. *International Journal of Dairy Science* (accepté).

Tormo, H., Arliguié, C., Couderc, C., Ali Haimoud Lekhal, D., Roques, C. Phenotypic and Genotypic characterization of lactic bacteria of raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* (soumis).

COMMUNICATIONS ORALES

Tormo, H., Ali haimoud - Lekhal, D., Laithier, C., 2006. Les microflores utiles des laits crus de vache et de chèvre : principaux réservoirs et impact de certaines pratiques d'élevage. 13ème Rencontre Recherche Ruminants. Journées 3R, 6-7 décembre.

Tormo, H., Ali haimoud - Lekhal, D., Lopez, C., 2007. Diversité microbienne des laits crus de chèvre destinés à la transformation fromagère et pratiques des producteurs. 14ème Rencontre Recherche Ruminants. Journées 3R, 6-7 décembre.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Tormo, H., Ali haimoud - Lekhal, D., Lopez, C., Ogier J-C, Roques, C., 2007. Variabilité des flores microbiennes du lait cru selon les conditions d'élevage et de production du lait. INRA, Club des bactéries lactiques, 13-15 Novembre 2007, Rennes.

Tormo, H., Ali haimoud - Lekhal, D., Lopez, C., OGIER, J-C., Roques, C., 2007. Microbiological characteristics of goat milk based on phenotypic and PCR -TTGE analysis and links with farm conditions. FORMATEX, Bioworld 2007, Séville.

Tormo, H., Ali haimoud - Lekhal, D., Roques, C., 2009. Variabilité des bactéries lactiques dominantes des laits crus de chèvre en fonction des conditions de production. INRA, Club des bactéries lactiques, 27 - 29 Mai 2009, Toulouse

AUTRES

Participation à la rédaction d'un ouvrage technique de synthèse : « Microflore du lait cru ». Institut de l'Élevage (Coordinateur).

Références bibliographiques

A

Abd-El-Malek, Y., Gibson, T., 1952. Studies in the bacteriology of milk. III. The corynebacteria of milk. *J.Dairy Res* 19, 153-159.

Agreste Graphagri, 2007. L'agriculture, la forêt et les industries agroalimentaires. Agreste Graphagri France, Paris. Vol 1, 167p.

Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Marino, R., Centoducati, P., Sevi, A., 2005. Effect of different ventilation regimens on ewes' milk and Canestrato Pugliese cheese quality in summer. *Journal of Dairy Research* 72, 447-455.

Albenzio, M., Taibi, L., Muscio, A., Sevi, A., 2002. Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk. *Small Ruminant Research* 43, 219-226.

Aleksieva, V., Krushev, B., 1981. The quality of raw cow milk. *Veterinarno Meditsinski Nauki* 18, 65-71.

Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Bernardo, A., Garcia-Lopez, M.L., 2002. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. *Letters in Applied Microbiology* 34, 134-138.

B

Bachmann, H.P., McNulty, D.A., McSweeney, P.L.H., Ruegg, M., 1996. Experimental designs for studying the influence of the raw milk flora on cheese characteristics: A review. *Journal of the Society of Dairy Technology* 49, 53-56.

Badis, A., Guetarni, D., Boudjema, B.M., Henni, D.E., Kihal, M., 2004a. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. *Food Microbiology* 21, 579-588.

- Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjemaa, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E., Kihal, M., 2004b. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. *Food Microbiology* 21, 343-349.
- Baker, GC., Smith, JJ., Cowan, DA., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55, 541-555.
- Barral, J., Doutard, E., Guezenoc, C., Karsenti, C., Laithier, C. 2008. Influence de la pratique de la prématuration sur la qualité du lait, l'acidification et la qualité des fromages de chèvre de type lactique . Rapport technique, Actilait, 60pp.
- Batdorj, B., Trinetta, V., Dalgarrondo, M., Prevost, H., Dousset, X., Ivanova, I., Haertle, T., 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* 103, 584-593.
- Bedidi-Madani, N., Greenland, T., Richard, Y., 1998. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk. *Veterinary Microbiology* 59, 139-145.
- Berdague, J.L., Grappin, R., Chaillet, B., Clement, J.F., 1990. Sensory analysis of french emmentaler - grand-cru. *Lait* 70, 133-145.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11, 259-274.
- Bergère, J-L., Tourneur, C., 1992. Les bactéries de surface des fromages. In: les groupes microbiens d'intérêts laitiers, CEPIL (Ed), Paris, 127-163.
- Bergonnier, D., De Cremoux, R., Rupp, R., Lagriffoul, G., Berthelot, X., 2003. Mastitis of dairy small ruminants. *Vet. Res* 34: 689-716.

- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., Gueguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126, 278-285.
- Berthier, F., Beuvier, E., Dasen, A., 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.
- Beuvier, E., Berthaud, K., Cegarra, S., Dasen, A., Pochet, S., Buchin, S., Duboz, G., 1997. Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. *International Dairy Journal* 7, 311-323.
- Beuvier, E., Feutry, F., 2005. Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. <http://www.pole-fromager-aoc-mc.org/doc/Basesmicrobiologie.pdf>
- Bhowmik, T., Marth, E.H., 1990. Rôle of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening - a review. *Journal of Dairy Science* 73, 859-866.
- Bockelmann, W., 2002. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *International Dairy Journal* 12, 123-131.
- Bockelmann, W., and Hoppe-Seyler, T., 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cows and goats milk. *Int. Dairy J* 11: 307-314.
- Bockelmann, W., Hoppe-Seyler, T., 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal* 11, 307-314.
- Bockelmann, W., HoppeSeyler, T., Krusch, U., Hoffmann, W., Heller, K.J., 1997. The microflora of Tilsit cheese.2. Development of a surface smear starter culture. *Nahrung-Food* 41, 213-218.
- Bolotin, A., Ehrlich, S.D., Sorokin, A., 2002. Studies of genomes of dairy bacteria *Lactococcus lactis*. *Club des bactéries lactiques n°11*, 22, 45-53.

- Bouton, Y., Guyot, P., Beuvier, E., Tailliez, P., Grappin, R., 2002. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comte cheese ripening. *International Journal of Food Microbiology* 76, 27-38.
- Bouton Y, Guyot P, Beuvier E. 2006. Diversité génomique et temporelle des flores lactobacilles, bactéries propioniques et entérocoques isolées de laits crus. Colloque SFM, 7 novembre, Paris.
- Bouton, Y., Guyot, P., Grappin, R., 1998. Preliminary characterization of microflora of Comte cheese. *Journal of Applied Microbiology* 85, 123-131.
- Bouton, Y., Grappin, R., 1995. Comparison of the final quality of a swiss-type cheese made from raw or microfiltered milk. *Lait* 75, 31-44
- Bouton, Y., Tessier, T., Guyot, T.P., Beuvier, E., 2005. Relation entre les pratiques des producteurs et les niveaux de populations microbiennes des laits à Comté. 12 ième Rencontres Recherches.Ruminants. Institut de l'Elevage-INRA, Paris, 403-403.
- Bouton, Y., Guyot, P., Vacheyrou, M., Normand AC., Piarroux, R., Beuvier E., 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Exemples des LHF. 15^{ème} colloque du Club des Bactéries Lactiques, 13-15 Novembre, Rennes.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W.H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 53, 33-41.
- Brennan, N.M., Ward, A.C., Beresford, T.P., Fox, P.F., Goodfellow, M., Cogan, T.M., 2002. Biodiversity of the bacterial flora on the surface of a smear cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 820-830.
- Buchin, S. and Beuvier, E., 2000. The specificity of raw milk cheeses: The role of natural microflora of milk. 7ième Rencontre Recherches Ruminants. Institut de l'Elevage-INRA, Paris, 361-363.

Buchin, S., Delague, V., Duboz, G., Berdague, J.L., Beuvier, E., Pochet, S., Grappin, R., 1998. Influence of pasteurization and fat composition of milk on the volatile compounds and flavor characteristics of a semi-hard cheese. *Journal of Dairy Science* 81, 3097-3108.

C

Callon, C., Duthoit, F., Delbes, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., De Cremoux, R., Montel, M.C., 2007. Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: Molecular approaches. *Syst. Applied Microbiol* 30: 547-560.

Callon, C., Millet, L., Montel, M.C., 2004. Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. *Journal of Dairy Research* 71, 231-244.

Caridi, A., Micari, P., Caparra, P., Cufari, A., Sarullo, V., 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal* 13, 191-200.

Carnio, M. C., Holtzel, A., Rudolf, M., Heule, T., Jung, G., 2000. The macrocyclic peptide antibiotic micrococcin P-1 is secreted by the food-borne bacterium *Staphylococcus equorum* WS 2733 and inhibits *Listeria monocytogenes* on soft cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 66(6): 2378-2384.

Carpentier, B., Cerf, O., 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food-industry. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 499-511.

Carunchia Whetstine, M.E., Drake, M.A., Nelson, B.K., Barbano, D.M., 2006. Flavor profiles of full-fat and reduced-fat cheese and cheese fat made from aged Cheddar with the fat removed using a novel process. *J Dairy Sci* 89, 505-517.

Casalta, E., 2003. Maîtrise de la qualité du Vénaco, un fromage au lait cru. Bases scientifiques pour la mise au point de ferments sélectionnés. Thèse de doctorat de l'université de Dijon, France. 106 p.

- Casalta, E., Montel, M.C., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126, 271-273.
- Casalta, E., Sorba, J.M., Aigle, M., Ogier, J.C., 2009. Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology* 133, 243-251.
- Casalta, E., Vassal, Y., Desmazeaud, M.J., Casabianca, F., 1995. Comparison of the acidifying activity of *Lactococcus-lactis* isolated from corsican goat milk and cheese. *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28, 291-299.
- Cempirkova, R., 2007. Contamination of cow's raw milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factors. *Czech Journal of Animal Science* 52, 387-393.
- Centeno, J.A., Menendez, S., Hermida, M., Rodriguez-Otero, J.L., 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology* 48, 97-111.
- Centeno, J.A., Menendez, S., RodriguezOtero, J.L., 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology* 33, 307-313.
- Chamba, J.F., Bonnaz, G., Bourg, P., 1981. Comparisons between various methods to count the acidifying flora in raw-milk. *Lait* 61, 555-567.
- Chatelin, Y.M., Richard, J., 1981. Sources of bacterial contaminations of raw-milk in the farm. *Lait* 61, 80-94.
- Chatelin, Y.M., Richard, J., 1983. Comparison of the efficacy of 4 milking machine cleaning methods under unsupervised field conditions. *Lait* 63, 87-101.
- Cheriguene, A., Chougrani, F., Bekada, A.M.A., El Soda, M., Bensoltane, A., 2007. Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. *African Journal of Biotechnology* 6, 1854-1861.

- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G., 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* 12, 407-411.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuquier, E., BianchiSalvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodriguez, E., 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research* 64, 409-421.
- Coiffier, O., 1992. Les bactéries coliformes. In : les groupes microbiens d'intérêts laitiers CEPIL (ed), Paris, 303-323.
- Collins, M.D., 1981. The genus *Brevibacterium*. In : "The Prokaryotes, a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria", Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. et Schlegel, H.G., (eds), Springer-Verlag, Berlin. Vol 2. Chap 61, 1351-1354
- Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S., 1993. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages - description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 595-603.
- Communauté Européenne, 2005. Règlement (CE) n°2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicable aux denrées alimentaires. *Journal officiel de l'Union Européenne*, 22/12/2005, 1-26.
- Coppola, S. and D. Ercolini, 2008. Dairy Products. *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*, Cocolin, L. and D. Ercolini (Eds.). Chap. II, Springer, New York, USA., 31-90
- Corroler, D., Desmasures, N., Guéguen, M., 1999. Correlation between polymerase chain reaction analysis of the histidine biosynthesis operon, randomly amplified polymorphic DNA analysis and phenotypic characterization of dairy *Lactococcus* isolates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51, 91-99.

Corroler, D., Mangin, I., Desmasures, N., Gueguen, M., 1998. An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the camembert cheese registered designation of origin area. *Appl Environ Microbiol* 64, 4729-4735.

Crombach, W.H., 1974. Relationships among coryneform bacteria from soil, cheese and sea fish. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 40, 347-359.

D

D'Amico, D.J., Groves, E., Donnelly, C.W., 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *Journal of Food Protection* 71, 1580-1589.

Dalmaso, M., 2009. Etude de l'influence du repiquage sur la complexité des lactosérums levains. Application aux modèles fromagers de type pâte pressée non cuite et de type mixte à dominante lactique. Thèse de Doctorat de Biologie Appliquée, Université de Savoie, 219 pages.

Dalmaso, M., Hennequin, D., Duc, C., Demarigny, Y., 2009. Influence of backslopping on the acidifications curves of "Tomme" type cheeses made during 10 successive days. *Journal of Food Engineering* 92, 50-55.

Dalmaso, M., Prestoz, S., Rigobello, V., Demarigny, Y., 2008. Behavior of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar. *diacetylactis* in a Four *Lactococcus* Strain Starter during Successive Milk Cultures. *Food Science and Technology International* 14, 469-477.

De Buyser, M.L., Lapeyre, C., 1994. Mammites à staphylocoques et sécurité alimentaire. *Le point vétérinaire*, 1994, 26, numéro spécial « Ruminants et santé publique », 79-82.

De Cremoux, R., Barral, J., Beuvier, E., Callon, C., Gilbert, F., Montel, M.C., Raynal-Ljutovac, K., 2008. Caractérisation et entérotoxigénicité des souches de *S.aureus* en filière caprine, identification des risques de contamination et étude d'outils de contrôle en vue de leur maîtrise, de la production à la transformation. Institut de l'Élevage, Paris. *Compte rendu* N° 150838016, 238 pages.

- Deibel, R.H., 1964. Group D streptococci. *Bacteriological Reviews* 28, 330-340
- Delgado, S., Mayo, B., 2004. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 90, 309-319.
- Delgado-Pertinez, M., Alcalde, M.J., Guzman-Guerrero, J.L., Castel, J.M., Mena, Y., Caravaca, F., 2003. Effect of hygiene-sanitary management on goat milk quality in semi-extensive systems in Spain. *Small Ruminant Research* 47, 51-61.
- De Los Reyes Gavilan, C.G., Limsowtin, G.K.Y., Tailliez, P., Sechaud, L., Accolas, J.P., 1992. A lactobacillus-helveticus-specific Dna probe detects restriction-fragment-length-polymorphisms in this species. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3429-3432.
- Dellaglio, F., De Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., Janssens, D., 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In : *Bactéries Lactiques (Tome I)*, Lorica (ed), 25-70.
- Demarigny, Y., Beuvier, E., Buchin, S., Pochet, S., Grappin, R., 1997. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses .2. Biochemical and sensory characteristics. *Lait* 77, 151-167.
- Demarigny, Y., Beuvier, E., Dasen, A., Duboz, G., 1996. Influence of raw milk microflora on the characteristics of Swiss-type cheeses .1. Evolution of microflora during ripening and characterization of facultatively heterofermentative lactobacilli. *Lait* 76, 371-387.
- Demarigny, Y., Sabatier, C., Laurent, N., Prestoz, S., Rigobello, V., Blachier, M.J., 2006. Microbiological diversity in natural whey starters used to make traditional rocamadour goat cheese and possible relationships with its bitterness. *Italian Journal of Food Science* 18, 261-276.
- Desmasures, N., Bazin, F., Gueguen, M., 1997a. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology* 83, 53-58.

- Desmasures, N., Beuvieur, E., 2010 . Chap,1.1. Ce qu'il faut savoir avant d'intervenir sur les laits, nature et quantité des microflores des laits. In : Microflore du lait cru (Ouvrage collectif en cours de réalisation dans le cadre du RMT « Filières fromagères valorisant leur terroir »). Laithier, C., Coordinatrice. Technipel (Ed), Paris.
- Desmasures, N., Gueguen, M., 1997c. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. *Journal of Dairy Research* 64, 271-280.
- Desmasures, N., Opportune, W., Gueguen, M., 1997b. *Lactococcus* spp., yeasts and *Pseudomonas* spp. on teats and udders of milking cows as potential sources of milk contamination. *International Dairy Journal* 7, 643-646.
- Desmasures, N., Radiguet, S., Lejeune, J., Gueguen, M., 1995. Effect of ripening on the microbiological profile of high-quality raw-milk for cheese-making. *Milchwissenschaft-Milk Science International* 50, 193-195.
- Denis, C., Desmasures, N., 2005. Etude du lien entre la nature de la flore prairiale et les caractéristiques des laits normands. Journées nationales des techniciens laitiers fermiers, Pont l'Evêque, sept. 2005.
- Denis, C., Gueguen, M., Henry, E., Levert, D., 2001. New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Lait* 81, 365-379.
- Denis, C., Irlinger, F., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: Aerobic coryneform bacteria isolated from the surface of smear-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 126, 311-315.
- Desmazeaud, M., 1992. Les bactéries lactiques. In : les groupes microbiens d'intérêts laitiers CEPIL (Ed), Paris, 9-60.
- Devoyod, J.J., Poullain, F., 1988. The *Leuconostocs* - characteristics - their role in dairy-technology. *Lait* 68, 249-279.

- Devriese, L.A., Pot, B., Collins, M.D., 1993. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *Journal of Applied Bacteriology* 75, 399-408.
- Devriese, L.A., Schleifer, K.H., Adegoke, G.O., 1985. Identification of coagulase-negative staphylococci from farm-animals. *Journal of Applied Bacteriology* 58, 45-55.
- Dicks, L.M.T., Dellaglio, F., Collins, M.D., 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc-oenos* as *Oenococcus-oeni* corrig gen-nov, comb-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 395-397.
- Dortu, C., Thonart, P., 2009. Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation. *Biotechnologie Agronomie Societe Et Environnement* 13, 143-154.
- Duthoit, F., Callon, C., Tessier, L., Montel, M.C., 2005. Relationships between sensorial characteristics and microbial dynamics in "Registered Designation of Origie' Salers cheese. *International Journal of Food Microbiology* 103, 259-270.

E

- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., Ogier, J.C., 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1248-1255.
- Elgazzar, F.E., Bohner, H.F., Marth, E.H., 1992. Antagonism between *Listeria-monocytogenes* and lactococci during fermentation of products from ultrafiltered skim milk. *Journal of Dairy Science* 75, 43-50.
- Elmoslemany, A.M., Keefe, G.P., Dohoo, I.R., Dingwell, R.T., 2009a. Microbiological quality of bulk tank raw milk in Prince Edward Island dairy herds. *Journal of Dairy Science* 92, 4239-4248.

- Elmoslemany, A.M., Keefe, G.P., Dohoo, I.R., Jayarao, B.M., 2009b. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 1: Overall risk factors. *Journal of Dairy Science* 92, 2634-2643.
- Elmoslemany, A.M., Keefe, G.P., Dohoo, I.R., Jayarao, B.M., 2009c. Risk factors for bacteriological quality of bulk tank milk in Prince Edward Island dairy herds. Part 2: Bacteria count-specific risk factors. *Journal of Dairy Science* 92, 2644-2652.
- Ercolini, D., Frisso, G., Mauriello, G., Salvatore, F., Coppola, S., 2008. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of caciocavallo silano PDO cheese. *International Journal of Food Microbiology* 124, 164-170.
- Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F., 2009a. Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* 26, 228-231.

F

- Fadda, M.E., Viale, S., Deplano, M., Pisano, M.B., Cosentino, S., 2010. Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sardinia. *International Journal of Food Microbiology* 136, 376-380.
- Facklam, R., Carvalho, M.G., Teixeira, L., 2002. History, taxonomy, biochemical characteristics and antibiotic susceptibility testing of enterococci. In *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance* Gilmore, M (ed), Washington, DC: ASM Press, 1-54.
- Falkenberg, U., Reinhold, U., Hildebrandt, P., Heuwieser, G., 2006. Seasonal influence on the development of microbiological colonization on surfaces of liners and flushing adapters in a newly installed parlor. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 113, 3-6.
- Feil, E.J., 2004. Small change: Keeping pace with microevolution. *Nature Reviews Microbiology* 2, 483-495.

- Feutry, F., Oneca, M., Berthier, F. Torre, P. 2010. Biodiversity and dynamics of lactic acid bacteria in PDO Ossau-Iraty cheese made from raw ewe's milk. *Int J Food Microbiol*, soumis.
- Foschino, R., Invernizzi, A., Barucco, R., Stradiotto, K., 2002. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research* 69, 213-225.
- Fox, P.F., Wallace, J.M., Morgan, S., Lynch, C.M., Niland, E.J., Tobin, J., 1996. Acceleration of cheese ripening. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 70, 271-297.
- Frahm, E., Heiber, I., Hoffmann, S., Koob, C., Meier, H., Ludwig, W., Amann, R., Schleifer, K.H., Obst, U., 1998. Application of 23S rDNA-targeted oligonucleotide probes specific for enterococci to water hygiene control. *Systematic and Applied Microbiology* 21, 450-453.
- Fröhlich-Wyder, MT., 2003 Yeasts in dairy products. *Yeasts in Food – Beneficial and Detrimental Aspects*. Boekhout T et Robert V, eds, pp. 209 – 237. Behr's Verlag, Hamburg.

G

- Garcia, A., Rivero, J., Gonzales, P., Valero-Leal, K., Izquierdo, P., Colmenares, C., 2009. Bacteriological quality of raw goat milk produced in Faria parish, Miranda Municipality, Zulia state, Venezuela. *Revista De La Facultad De Agronomia De La Universidad Del Zulia* 26, 59-77.
- Garcia, M.C., Garcia, M.L., Otero, A., Moreno, B., 1988. Correlation between DNA-base composition and routine tests for the identification of Micrococcaceae isolated from sheeps milk cheese. *Systematic and Applied Microbiology* 10, 180-184.

- Garde, S., Avila, M., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M., 2006. Proteolysis of Hispanico cheese manufactured using lacticin 481-producing *Lactococcus lactis* ssp *lactis* INIA 639. *Journal of Dairy Science* 89, 840-849.
- Gay, M., Amgar, A., 2005. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. *Lait* 85, 153-170.
- Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Condon, S., Swings, J., Cogan, T.M., 2001. Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *International Journal of Food Microbiology* 71, 177-188.
- Giannino, M.L., Aliprandi, M., Feligini, M., Vanoni, L., Brasca, M., Fracchetti, F., 2009a. A DNA array based assay for the characterization of microbial community in raw milk. *Journal of Microbiological Methods* 78, 181-188.
- Giannino, M.L., Marzotto, M., Dellaglio, F., Feligini, M., 2009b. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* 130, 188-195.
- Gill, J. J., P. M. Sabour, Gong, J.H, Yu, H., Leslie, K.E., Griffiths, M.W., 2006. Characterization of bacterial populations recovered from the teat canals of lactating dairy and beef cattle by 16S rRNA gene sequence analysis. *Fems Microbiology Ecology* 56(3): 471-481.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 88, 215-222.
- GIS Alpes du Nord. Gestion de la Flore Microbienne des laits crus par les pratiques des producteurs - 2009. Document technique du GIS Alpes du Nord. 55p
- Goldberg, J.J., Wildman, E.E., Pankey, J.W., Kunkel, J.R., Howard, D.B., Murphy, B.M., 1992. The influence of intensively managed rotational grazing, traditional continuous grazing, and confinement housing on bulk tank milk quality and udder health. *Journal of Dairy Science* 75, 96-104.

- Gonzalez De Llano, D., Cuesta, P., Rodriguez, A., 1998. Biogenic amine production by wild lactococcal and *Leuconostoc* strains. Letters in Applied Microbiology 26, 270-274.
- Gonzalo, C., Carriedo, J.A., Beneitez, E., Juarez, M.T., De La Fuente, L.F., San Primitivo, F., 2006. Short communication: Bulk tank total bacterial count in dairy sheep: Factors of variation and relationship with somatic cell count. Journal of Dairy Science 89, 549-552.
- Grappin, R., Beuvier, E., 1997. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. International Dairy Journal 7, 751-761.
- Grappin, R., Beuvier, E., Bouton, Y., Pochet, S., 1999. Advances in the biochemistry and microbiology of Swiss-type cheeses. Lait 79, 3-22.
- Grappin, R., Beuvier, E., Bouton, Y., Pochet, S., 1999. Advances in the biochemistry and microbiology of Swiss-type cheeses. Lait 79, 3-22.
- Grappin, R., Rank, T.C., Olson, N.F., 1985. Primary proteolysis of cheese proteins during ripening - a review. Journal of Dairy Science 68, 531-540.
- Gutiérrez-Mendez, N., Vallejo-Cordoba, B., Gonzalez-Cordova, A.F., Nevarez-Moorillon, G.V., 2007. Evaluation of aroma generation of *Lactococcus lactis* with an electronic nose and sensory analysis. Journal of Dairy Science 91, 49-57.

H

- Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C., 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. International Dairy Journal 14, 467-494.
- Hermier, J., Lenoir, J., Weber, F., 1992. Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CEPIL, Paris. 568pp.
- Herreros, M.A., Fresno, J.M., Prieto, M.J.G., Tornadijo, M.E., 2003. Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). International Dairy Journal 13, 469-479.

Heuchel, V., Marly, J., Meffe, N., 2001. Origines, diagnostic et moyens de maîtrise de la contamination du lait de vache par les salmonelles. 8^{ième} Rencontres Recherches Ruminants. Institut de l'Elevage-INRA, Paris, 87-90.

Hoppe-Seyler, T., Jaeger, B., Bockelmann, W., Heller, K.J., 2000. Quantification and identification of microorganisms from the surface of smear cheeses. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 52, 294-305.

I

IDF, 1985. Enumeration of Coliforms. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

IDF, 1991. Enumeration of Yeasts and Moulds. FIL-IDF Standard No.94B. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

IDF, 1991a. Enumeration of Microorganisms-Colony Count at 30°C. FIL-IDF Standard No.141B. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

Institut de l'Elevage, FNEC, FNPL, 2008. Guide des bonnes pratiques d'hygiène pour les fabrications de produits laitiers et fromagersfermiers. Troisième Edition, Technipel.

Irlinger, F., 2000. Caractérisation phénotypique et moléculaire de la diversité des bactéries d'intérêts technologiques de la surface des fromages. Thèse de doctorat de l'INA PG, 172p.

Irlinger, F., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. *International Journal of Food Microbiology* 126, 302-310.

Irlinger, F., Morvan, A., ElSolh, N., Bergere, J.L., 1997. Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 20, 319-328.

Isolini, D., M. Grand and H. Glattli 1990. Selective medium for homofermentative and heterofermentative lactobacilli. *Schweiz Milch Forschung.*, 19 : 57-59.

J

Jayne-Williams, D.J.; Skerman, T.M., 1966. Comparative studies on coryneform bacteria from milk and dairy sources. *J.Appl. Bacteriol.* 29, 72-92.

Jeanson, S., 2000. La maturation du lait dans la fabrication de fromages à pâte pressée cuite : le rôle des lactocoques. Thèse de doctorat de l'université de Dijon, France.243p.

Jan, L., Rademaker, W., Herbet, H., Starrenburg, M, J.C., Naser, S M., Gevers D., Kelly, W J., Hugenholtz, J., Swings, J., Van Hycama Vlieg, J, E.T., 2007. Diversity Analysis of Dairy and Nondairy *Lactococcus lactis* Isolates, Using a Novel Multilocus Sequence Analysis Scheme and (GTG)₅-PCR Fingerprinting, *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7128-7137.

Jayarao, B.M., Pillai, S.R., Sawant, A.A., Wolfgang, D.R., Hegde, N.V., 2004. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *Journal of Dairy Science* 87, 3561-3573.

Joandel, E., 2007, Facteurs de variabilité des flores microbiennes en surface des trayons des vaches laitières ; rapport de fin de stage, ENITAC, 44 p.

Jones, D., Collins, M.D., 1986. Irregular, nonsporing Gram-positive rods. *In* : "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Vol 2, 1261-1434. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E et Holt, J.G., Eds, Williams and Wilkins, Baltimore.

Jurkovic, D., Krizkova, L., Sojka, M., Belicova, A., Dusinsky, R., Krajcovic, J., Snauwaert, C., Naser, S., Vandamme, P., Vancanneyt, M., 2006. Molecular identification and diversity of enterococci isolated from Slovak Bryndza cheese. *Journal of General and Applied Microbiology* 52, 329-337.

K

- Kagkli, D.M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P., Cogan, T.M., 2007. *Enterococcus* and *Lactobacillus* contamination of raw milk in a farm dairy environment. *International Journal of Food Microbiology* 114, 243-251.
- Kandler, O., Weiss, N., 1986. Genus *Lactobacillus*. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.*, vol 2. P.H.A, Sneath., N.S, Mair., Sharpe, M.E., Holt, J.G (Ed). Williams and Wilkins, Baltimore, M.D.
- Kalogridou-Vassiliadou, D., Manolkidis, K., Hatziminaoglou, J., 1991. Changes in mastitis pathogens in goat milk throughout lactation. *Small Rumin. Res* 4: 197-201.
- Kanawjia, S.K., Nageswara Rao, K., Singh, S., Sabikhi, L., 1996. Role of *Lactobacilli* in cheese. *Indian Journal of Dairy Science* 46, 187-197.
- Kass, G.V., 1980. An exploratory technique for investigating large quantities of categorical data. *Applied Statistics* 29, 119-126.
- Keddie, R.M., Leask, B.G.S., Grainger, J.M., 1966. A comparison of coryneform bacteria from soil and herbage: Cell wall composition and nutrition. *J.Appl. Bacteriol* 29, 17-43.
- Kieronczyk, A., Skeie, S., Langsrud, T., Yvon, M., 2003. Cooperation between *Lactococcus lactis* and nonstarter lactobacilli in the formation of cheese aroma from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 734-739.
- Kim, S.Y., Adachi, Y., 2007. Biological and genetic classification of canine intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Microbiology and Immunology* 51, 919-928.
- Klaenhammer, T.R., 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39-86.

- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A., Altermann, E., 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 393-409.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H., Devos, W.M., 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 788-792.
- Kloos, W.E., 1980. Natural-populations of the genus *Staphylococcus*. *Annual Review of Microbiology* 34, 559-592.
- Kloos, W.E., Bannerman, T.L., 1994. Update on clinical-significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 7, 117-140.
- Kloos, W.E., Musselwhite, M.S., 1975. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Applied Microbiology* 30, 381-395.
- Kloos, W.E., Wolfshohl, J.F., 1991. *Staphylococcus-cohnii* subspecies - *Staphylococcus-cohnii* subsp *cohnii* subsp-nov and *Staphylococcus-cohnii* subsp *urealyticum* subsp-nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 284-289.
- Kure, C.F., Skaar, I., Brendehaug, J., 2004. Mould contamination in production of semi-hard cheese. *International Journal of Food Microbiology* 93, 41-49.
- Kyozaire, J.K., Veary, C.M., Petzer, I.M., Donkin, E.F., 2005. Microbiological quality of goat's milk obtained under different production systems. *Journal of the South African Veterinary Association-Tydskrif Van Die Suid-Afrikaanse Veterinere Vereniging* 76, 69-73.

L

- Lafarge, V., Ogier, J.C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A., 2004. Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5644-5650.
- Laithier, C., Chatelin, Y.M., David, V., Talon, R., Labadie, J., Barral, J., Tormo, H., Lefrileux, Y., Morge, S., 2005a. « Améliorer la maîtrise de la qualité des fromages fermiers par une meilleure caractérisation des biofilms et de leur rôle ». Edition Technipel 2005, collection résultats. Compte rendu final 150531011, 64p.
- Laithier, C., Chatelin, Y.M., Talon, R., Barral, J., Tormo, H., Lefrileux, Y., 2005b. Efficacité en laboratoire puis en exploitations de procédures de nettoyage / désinfection sur la sélection positive des biofilms. 12ième Rencontres Recherches Ruminants. Institut de l'Elevage-INRA, Paris, 367-370.
- Laithier, C., Chatelin, Y.M., Tormo, H., Barral, J., Tormo, H., Morge, S., Lefrileux, Y., Gauzere, Y., Thomas, A., 2004a. Identifier les facteurs ayant une incidence sur l'acidification des laits dans les technologies fromagères fermières (caillés lactiques) utilisant du lactosérum en tant que ferment afin d'en améliorer la maîtrise. Edition Technipel 2005, collection résultats. Compte rendu final 150431009, 77 p.
- Laithier, C., Chatelin, Y.M., Tormo, H., Lefrileux, Y., 2004b. Les biofilms dans les exploitations fabriquant du fromage de chèvre de type lactique : Localisation, nature et rôle dans la qualité des produits. 11ième Rencontres Recherche Ruminant, Institut de l'Elevage-INRA, Paris, France, 112 p.
- Lamprell, H., 2003. Production des entérotoxines dans les fromages en fonction de la diversité phénotypique et génétique des souches de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat de l'Université de Bourgogne.190p.

- Larruhath, A., 2009. La pratique de prématuration entraîne t'elle des effets différents sur l'acidification et la qualité des fromages de chèvre à pâte lactique, selon le profil microbiologique du lait ? Rapport de stage, INP-ENSAT, Actilait, 60p.
- Law, J., Buist, G., Haandrikman, A., Kok, J., Venema, G., Leenhouts, K., 1995. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus-lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *Journal of Bacteriology* 177, 7011-7018.
- Lemieux, L., Simard, R.E., 1991. Bitter flavor in dairy-products .1. a review of the factors likely to influence its development, mainly in cheese manufacture. *Lait* 71, 599-636.
- Lenoir, J., Lamberet, G., Schmidt, J.L., 1983. L'élaboration d'un fromage : l'exemple du camembert. *Pour La Science* 69, 30-42.
- Leriche, F., Bordessoules, A., Fayolle, K., Karoui, R., Laval, K., Leblanc, L., Dufour, E., 2004. Alteration of raw-milk cheese by *Pseudomonas* spp.: monitoring the sources of contamination using fluorescence spectroscopy and metabolic profiling. *Journal of Microbiological Methods* 59, 33-41.
- Lonvaudfunel, A., Joyeux, A., 1994. Histamine production by wine lactic-acid bacteria - isolation of a histamine-producing strain of *Leuconostoc-oenos*. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 401-407.
- Loveland-Curtze, J., Sheridan, P.P., Gutshall, K.R., Brenchley, J.E., 1999. Biochemical and phylogenetic analyses of psychrophilic isolates belonging to the *Arthrobacter* subgroup and description of *Arthrobacter psychrolactophilus*, sp nov. *Archives of Microbiology* 171, 355-363.
- Lynch, C.M., McSweeney, P.L.H., Fox, P.F., Cogan, T.M., Drinan, F.D., 1997. Contribution of starter lactococci and non-starter lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese with a controlled microflora. *Lait* 77, 441-459.

M

- Macedo, A.C., Malcata, F.X., Hogg, T.A., 1995. Microbiological profile in serra ewes cheese during ripening. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 1-11.
- Mallet, A., Guéguen, M., Desmasures, N., 2010. Etat des lieux de la diversité microbienne quantitative et qualitative de laits crus normands destinés à la transformation fromagère. 8ème Congrès National de la SFM, 2-4 juin 2010, Marseille.
- Manopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., Anifantakis, E.M., 2003. Evolution of microbial population during traditional feta cheese manufacturing and ripening. *International Journal of Food Microbiology* 82, 153-161.
- Massa, S., Turtura, G.C., 1989. Identification of staphylococci and micrococci isolated from hard cheese made from raw cow and sheep milk. *Milchwissenschaft-Milk Science International* 44, 219-221.
- Mauriello, G., Moio, L., Moschetti, G., Piombino, P., Addeo, F., Coppola, S., 2001. Characterization of lactic acid bacteria strains on the basis of neutral volatile compounds produced in whey. *Journal of Applied Microbiology* 90, 928-942.
- Maurizio, A., 1932. Histoire de l'alimentation végétale de la préhistoire jusqu'à nos jours. Payot, ED, Paris. 647 p.
- McKinnon, C.H., Rowlands, G.J., Bramley, A.J., 1990. The effect of udder preparation before milking and contamination from the milking plant on bacterial numbers in bulk milk of 8 dairy herds. *Journal of Dairy Research* 57, 307-318.
- Ménard, J.L., Roussel, P., Masselin-Silvin, S., Puthod, R., Hetreau, T., Forêt, A., Houssin, B., Aracil, C., Le Guenic, M., 2004. Contamination bactérienne d'une litière de stabulation libre paillée : effet de la fréquence de paillage et proposition d'une méthode pour son

- évaluation. 11^{ème} Rencontre Recherche Ruminants, Institut de l'Élevage-INRA, Paris, 403.
- Michel, V., Hauwuy, A., Chamba, J.F., 2001. Raw cowmilk microflora: diversity and influence of conditions of production. *Lait* 81, 575-592.
- Michel, V., Hauwuy, A., Montel, M.C., Coulon, J.B., Chamba, J.F., 2005. Pratiques d'élevage et composition microbienne des laits crus. Dans : Territoires et enjeux du développement régional. Lyon, 9-11 Mars 2005.
- Mietton, B., Desmazeaud, M., De Roissart, H., Weber, F., 1994. Transformation du lait en fromage, Chap. IV-3, *Lorica* (Ed), 55-133.
- Mohan, K., 1981. *Brevibacterium* species from poultry. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 47, 449-453.
- Montel, M.C., Beuvier, E., Hauwuy, A., 2003. Système d'élevage, microflore des laits et qualité des produits laitiers. *Prod. Anim.*, 16: 279-282.
- Monsallier F., Verdier-Metz I., Chanal J., Delbès C., Gagne G., Montel MC, 2009. Le trayon est-il une source de diversité microbienne du lait ? Journée de Restitution de l'UMT Trefl ; 3 juin 2009, Aurillac.
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., Jorganes, F., Munoz, R., 2003. Screening of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from grape must and wine. *International Journal of Food Microbiology* 84, 117-123.
- Morgan, F., Massouras, T., Barbosa, M., Roseiro, L., Ravasco, F., Kandarakis, I., Bonnin, V., Fistakoris, M., Anifantakis, E., Jaubert, G., Raynal-Ljutovac, K., 2003. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research* 47, 39-49.

N

Nahabieh, F., Schmidt, J.L., 1990. Study of the yeast flora composition of some wide varieties of goat cheese. *Lait* 70, 325-343.

Neviani, E., Mucchetti, G., 1982. Role of enterococci in Italian cheese .3. their development and activity in cheese with ripening media. *Latte* 7, 902-907.

Normand, A.C., Vacheyrou, M., Guyot, P., Bouton, Y., Dubief, T., Billot, M., Sudre, B., Cussenot, R., Piarroux, R., 2007. Etude des flux bactériens dans les étables de production laitière de Franche-Comté. Intérêts dans les domaines de la production fromagère. XIIIème Forum des Jeunes Chercheurs, Université de Franche-Comté, Université de Bourgogne, 14-15 juin, Dijon.

Normand, A.-C., Vacheyrou, M., Sudre, B., Heederik, D.J.J., Piarroux, R., 2009. Assessment of dust sampling methods for the study of cultivable-microorganism exposure in stables. *Appl Environ Microbiol* 75, 7617-7623.

O

Ogier, J.C., Lafarge, V. Girard, A. Rault, V. Maladen, A. Gruss, J.Y. Leveau and A. Delacroix-Buchet, 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 70 : 5628-5643.

Ogier, J.C., Serror, P., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* 126, 291-301.

Ogier, J.C., O. Son, A. Gruss, P. Tailliez and A. Delacroix-Buchet, 2002. Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied Environ. Microbiol* 68 : 3691-3701.

Owens, J.D., Keddie, R.M., 1969. Nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 32, 338-&.

P

Paris, D., Blondeau, R., 1999. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. from activated sludge of a pulp and paper mill. *Water Research* 33, 947-950.

Park, Y.J., Oh, E-J., Kim, B K., Kim, S M., In Shim, S., 1999. Phenotypic characteristics of *Enterococcus faecium* variants confirmed by intergenic ribosomal polymerase chain reaction and *E. faecium* polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 34, 269-273.

Pitcher, D.G., Noble, W.C., 1978. Aerobic diphtheroids of human skin. In: *Coryneform Bacteria*. Bousfield, I.J., and Callely, A.G (Eds), London, Academic Press.

Piton, C., Richard, J., 1982. Main sources of bacteria in moderately contaminated milk on farms in the Rennes area. *Lait* 62, 67-74.

Piton, C., Richard, J., 1985. Les *Pseudomonas*, psychrotrophes du lait cru. *Sciences Des Aliments* 5, 13-16.

Place, R.B., Hiestand, D., Burri, S., Teuber, M., 2002. *Staphylococcus succinus* subsp *casei* subsp *nov.*, a dominant isolate from a surface ripened cheese. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 353-359.

Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R., 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.

Pottier, I., Gente, S., Vernoux, J.P., Gueguen, M., 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. *International Journal of Food Microbiology* 126, 327-332.

R

- Rasolofo, E.A., St-Gelais, D., LaPointe, G., Roy, D., 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *International Journal of Food Microbiology* 138, 108-118.
- Raynaud, S., Heuchel, V., 2005. Surveillance et maîtrise de la prévalence du portage des *Escherchia coli* productrices de shiga-toxines (STEC) dans les élevages bovins. Recherche des moyens de prévention de la contamination du lait cru à la production. Institut de l'Elevage, Paris. *Compte rendu 150531001*, 124p.
- Raynaud, S., Paineau, S., Brun, T., 2005. Contamination du lait par différentes flores en Bretagne. 11ème Rencontres Recherches Ruminants, Décembre 2005. Institut de l'Elevage-INRA, Paris : 406-406.
- Reboux, G., Piarroux, R., Mauny, F., Madroszyk, A., Millon, L., Bardonnnet, K., Dalphin, J.C., 2001. Role of molds in farmer's lung disease in eastern France. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163, 1534-1539.
- Recsei, P.A., Gruss, A.D., Novick, R.P., 1987. Cloning, sequence, and expression of the lysostaphin gene from *Staphylococcus-simulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 1127-1131.
- Regula, G., Badertscher, R., Schaeren, W., Dalla Torre, M., Danuser, J., 2002. The effect of animal friendly housing systems on milk quality. *Milchwissenschaft-Milk Science International* 57, 428-431.
- Rendos, J.J., Eberhart, R.J., Kesler, E.M., 1975. Microbial-populations of teat ends of dairy-cows, and bedding materials. *Journal of Dairy Science* 58, 1492-1500.
- Richard, J., 1981. Adansonian classification and identification of psychrotrophic *Pseudomonas* from raw-milk held at low-temperature. *Annales De Microbiologie* A132, 171-182.

- Richard, J., 1983. Composition of dominant and subdominant flora of milk of poor bacteriological quality. *Lait* 63, 148-170.
- Richard, J., 1985. Indicator organisms of the microbial-contamination of the milk at farm. *Sciences Des Aliments* 5, 9-12.
- Richard, J., 1998. Natural bacteriostatic agents for healthy cheeses. *Biofutur*, 28-30.
- Richard, J., Braquehay, C., 1985. Coliforms in raw-milk. *Sciences Des Aliments* 5, 21-24.
- Rochat, T., Gratadoux, J.J., Gruss, A., Corthier, G., Maguin, E., Langella, P., van de Guchte, M., 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.

S

- Salmeron, J., de Vega, C., Perez-Elortondo, F.J., Albisu, M., Barron, L.J.R., 2002. Effect of pasteurization and seasonal variations in the microflora of ewe's milk for cheesemaking. *Food Microbiology* 19, 167-174.
- Sanaa, M., 1993. Epidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Thèse de doctorat, Université Paris X1, 207p.
- Saubusse, M., Millet, L., Delbes, C., Callon, C., Montel, M.C., 2007. Application of Single Strand Conformation Polymorphism - PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 116, 126-135.
- Schleifer, K.H., Fischer, U., 1982. Description of a new species of the genus *Staphylococcus* - *Staphylococcus-carnosus*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 32, 153-156.

- Schleifer, K.H., Kilpperbalz, R., Fischer, U., Faller, A., Endl, J., 1982. Identification of *Micrococcus-candidus* ATCC-14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of *Micrococcus-caseolyticus* ATCC-13548 and *micrococcus-varians* ATCC-29750 as members of a new species, *Staphylococcus-caseolyticus*. International Journal of Systematic Bacteriology 32, 15-20.
- Schleifer, K.H., Kilpperbalz, R., Kraus, J., Gehring, F., 1984. Relatedness and classification of *Streptococcus-mutans* and *Streptococcus-mutans*-like streptococci. Journal of Dental Research 63, 1047-1050. Schefferle, H.E., 1966. Coryneform bacteria in poultry deep litter. J.appl.Bacteriol. 29, 147-160.
- Schefferle, H.E., 1966. Coryneform bacteria in poultry deep litter. J.appl.Bacteriol. 29, 147-160.
- Sevi, A., Albenzio, M., Annicchiarico, G., Caroprese, M., Marino, R., Taibi, L., 2002. Effects of ventilation regimen on the welfare and performance of lactating ewes in summer. Journal of Animal Science 80, 2349-2361.
- Sevi, A., Albenzio, M., Muscio, A., Casamassima, D., Centoducati, P., 2003a. Effects of litter management on airborne particulates in sheep houses and on the yield and quality of ewe milk. Livestock Production Science 81, 1-9.
- Sevi, A., Taibi, L., Albenzio, M., Caroprese, M., Marino, R., Muscio, A., 2003b. Ventilation effects on air quality and on the yield and quality of ewe milk in winter. Journal of Dairy Science 86, 3881-3890.
- Steele, J.L., Unlu, G., 1992. Impact of lactic-acid bacteria on cheese flavor development. Food Technology 46, 128-135.
- Stiles, M.E., Holzapel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology 36, 1-29.
- Sudre, B., Vacheyrou, M., Braun-Fahrlander, C., Normand, A.C., Waser, M., Reboux, G., Ruffaldi, P., von Mutius, E., Piarroux, R., Grp, P.S., 2009. High levels of grass pollen

inside European dairy farms: a role for the allergy-protective effects of environment? *Allergy* 64, 1068-1073.

T

Takahashi, T., Satoh, I., Kikuchi, N., 1999. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 725-728.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol* 24, 1596-1599.

Todhunter, D.A., Smith, K.L., Hogan, J.S., 1991. *Serratia* species isolated from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science* 74, 1860-1865.

Torkar, K.G., Vengust, A., 2008. The presence of yeasts, moulds and aflatoxin M-1 in raw milk and cheese in Slovenia. *Food Control* 19, 570-577.

Tormo, H., Ali haimoud - Lekhal, D., Laithier, C., 2006. Les microflores utiles des laits crus de vache et de chèvre : principaux réservoirs et impact de certaines pratiques d'élevage. 13ème Rencontre Recherche Ruminants. Institut de l'Élevage-INRA, 305-308.

Tormo, H and Talliez, P., 2000. Contribution d'un levain naturel à la spécificité des fromages fermiers de chèvre (Natural starter contribution to the typicity of goat farm cheese). In: 7th International Conference on goats. Tours. 15-18 Mai 2000. Institut de l'Élevage and INRA, 583-585.

Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Carballo, J., Sarmiento, R.M., 1996. Population levels, species, and characteristics of *Micrococcaceae* during the manufacturing and ripening of Armada-Sobado hard goat's milk cheese. *Journal of Food Protection* 59, 1200-1207.

V

- Valdes-Stauber, N., Scherer, S., Seiler, H., 1997. Identification of yeasts and coryneform bacteria from the surface microflora of brick cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 34, 115-129.
- Valle, J., Piriz, S., de la Fuente, R., Vadillo, S., 1991. Staphylococci isolated from healthy goats. *Zentralbl Veterinarmed B* 38, 81-89.
- Vandenesh, F., Eykyn, S., Bes, M., Meugnier, H., Fleurette, J., Etienne, E., 1995. Identification and ribotypes of *Staphylococcus caprae* isolates as human pathogens and from goat milk. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 888-892
- Vasdinyei, R., Deak, T., 2003. Characterization of yeast isolates originating from Hungarian dairy products using traditional and molecular identification techniques. *International Journal of Food Microbiology* 86, 123-130.
- Vedamuthu, E.R., 1994. The dairy *Leuconostoc* - use in dairy-products. *Journal of Dairy Science* 77, 2725-2737.
- Verdier-Metz, I., Martin, B., Pradel, P., Albouy, H., Hulin, S., Montel, M.C., Coulon, J.B., 2005. Effect of grass-silage vs. hay diet on the characteristics of cheese: interactions with the cheese model. *Lait* 85, 469-480.
- Verdier-Metz, I., Michel, V., Delbes, C., Montel, M.-C., 2009. Do milking practices influence the bacterial diversity of raw milk? *Food Microbiology* 26, 305-310.
- Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Meugnier, H., Bes, M., Lasne, Y., Fiedler, F., Etienne, J., Freney, J., 2000. *Staphylococcus fleurettii* sp nov., isolated from goat's milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 1521-1527.

Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R., 1991. Distribution of repetitive dna-sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 6823-6831.

Von Eiff, C., Kokai-Kun, J.F., Becker, K., Peters, G., 2003. *In vitro* activity of recombinant lysostaphin against *Staphylococcus aureus* isolates from anterior nares and blood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 3613-3615.

Vyleteyola, M., Hanus, O., Urbanova, E., Kopunecz, P., 2000. The occurrence and identification of psychrotrophic bacteria with proteolytic and lipolytic activity in bulk milk samples at storage in primary production conditions. *Czech Journal of Animal Sciences*. 45, 373-383.

W

Wegmann, U., O'Connell-Motherwy, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M.J., Kuipers, O.P., van Sinderen, D., Kok, J., 2007. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology* 189, 3256-3270.

Wouters, J.T., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., Smit, G., 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12 : 91-109.

Y

Yi, H.R., Min, K.H., Kim, C.K., Ka, J.O., 2000. Phylogenetic and phenotypic diversity of 4-chlorobenzoate-degrading bacteria isolated from soils. *Fems Microbiology Ecology* 31, 53-60.

Z

Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J., De Vuyst, L., 2006. Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 487-495.

Zdanowicz, M., Shelford, J.A., Tucker, C.B., Weary, D.M., von Keyserlingk, M.A.G., 2004. Bacterial populations on teat ends of dairy cows housed in free stalls and bedded with either sand or sawdust. *Journal of Dairy Science* 87, 1694-1701.

Annexes

Annexe 1 : Enquêtes et suivis en exploitation

Date :

Nom du
technicien :

Nom de l'exploitant
.....

Prénom de l'exploitant
.....

n°EDE :

Adresse

Code postal

Localité.....

N° tel portable
.....

N° tel fixe
.....

I Caractéristiques de l'exploitation

Production annuelle livrée (l) : Quota (bovin) :

Vente directe (l) :

Nombre moyen d'animaux en lactation :

Production moyenne/animal lors de l'enquête (à calculer) :

Races :

Niveau de suivi :

CLO Oui Non

CL simplifié Oui Non

CL alterné Oui Non

Date du dernier contrôle du matériel de traite :

Fréquence du suivi par le technicien fromager :

Commentaires résultats contrôle laitier (au niveau cellulaire)

Mise bas groupée : Oui Non

Périodes de mise bas :

II Chèvrerie

Nombre d'animaux : Densité (m²/animal) :

Surface utile du bâtiment :

Surface des aires de couchage :

Présence d'aire d'exercice avec accès permanent :

II.1. Litière :

Litière : Paille Refus de foin Sciure Aucune

Paillage : Manuel Mécanique Mécanique + broyage

Avant la traite Pendant la traite Après la traite Absence

Quantité par chèvre (kg) ou nombre de bottes:.....

Nombre de paillages par jour :.....

Utilisation de produits pour litière Oui Non

Hiver Eté

Argile, anti-mouches, superphosphate, chaux, améliorateur de compost

Type, mode d'action :.....

Fréquence :.....

Quantité :.....

Etat des litières :

Souillage litière : Humide Sec

Paillage (épaisseur) : Suffisant Insuffisant

Propreté des litières : Satisfaisant Non satisfaisant

Gestion des litières :

Fréquence de curage :.....

Traitement après curage : Oui Non

Si oui, préciser :

II.2. Ambiance :

Bâtiment fermé : Oui Non

Système de ventilation actif : Oui Non

Courants d'air
(mamelles et gueule de l'animal) Oui Non

Odeur d'ammoniac : Oui Non

Sensation de confinement : Oui Non

Lumière : Suffisante Insuffisante

III Alimentation

	En lactation			Tarie		
	Hiver	Eté	Actuellement	Hiver	Eté	Actuellement
Type d'alimentation :						
foin	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ensilage d'herbe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
ensilage de maïs	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
enrubannage	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
concentrés	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Précisez le type :						
herbe pâturée	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Indiquez la diversité de la pâture :.....						

autre :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
parcours	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nature du foin :						
luzerne	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
prairie	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ray grass	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
autre :	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Quantité de fourrage distribuée lors de l'enquête : Kg /jour/chèvre
Quantité de concentré distribuée lors de l'enquête: Kg /jour/chèvre

Mise au pâturage ou parcours: Oui Non

Date de mise au pâturage :.....

Date de mise au parcours :.....

Rentrée soir Oui Non

Distribution de fourrage pendant la période de pâturage : Oui Non

Séparation du lieu de stockage des fourrages avec le lieu de traite : Oui Non

Présence de moisissures dans le fourrage : Oui Non

IV Conduite du troupeau

◆Traitements :

◆ Traitement antibiotique pendant la lactation : Oui Non

 Identification des animaux traités : Oui Non

 Méthode d'identification :.....

◆ Traitement antibiotique au tarissement : Oui Non

 Critère de choix des animaux traités par antibiotique :.....

◆ Traitements antiparasitaires : Oui Non

 Périodes :.....

◆ Traitements homéopathiques : Oui Non

◆ Huiles essentielles : Oui Non

◆ Mammites :

◆ Mammites cliniques, critères de détection :

 Test du plateau Inflammation Visuel Résultats de comptage

Période :

Fréquence :

Recherche systématique : Après mise bas Après traitement Aucune

Traitement, méthode :

V Machine à traire**V.1. Conception du matériel de traite**

Nombre de poste de traite :

Nombre de faisceaux trayeurs :

Type de décrochage :

 Manuel Automatique

Longueur de tuyaux (m) du manchon au tank :

Nombre d'accidents de parcours (coudes) :

Nombre de raccords de matériaux différents :

Coupure au décrochage :

 Oui Non

Circuit de nettoyage bouclé :

 Oui Non**V.2. Entretien de la machine à traire**

Age de la MAT :

Contrôle de l'installation :

 Oui Non

Fréquence :

par :

 Un agent agréé Autre :

Date du dernier contrôle de la machine à traire :

Corrections réalisées : Oui Non

◆ Manchons trayeurs et tuyaux à lait :

Date du dernier changement
des manchons trayeurs :.....
des tuyaux à lait :.....

Fréquence des changements
des manchons trayeurs Tous les ans Moins souvent
des tuyaux Tous les ans Moins souvent

◆ La filtration :

Filtration du lait : Oui Non

Filtration manuelle : Oui Non

Filtre intégré à la machine à traire : Oui Non

à usage unique : Oui Non

(**△ penser à garder le filtre, le mettre dans un sac stérile puis congélation △**)

Fréquence de nettoyage des filtres :.....

Fréquence de changement des filtres :.....

◆La canalisation à vide :

Fréquence de lavage de la canalisation à vide :.....

Date du dernier lavage de cette canalisation :.....

◆Le piège sanitaire :

Le piège sanitaire est-il lavable ? : Oui Non

VI Traite

Type de traite : Salle de traite Pots trayeurs Manuelle Lactoducs

VI.1. Propreté et ambiance salle de traite**◆ Propreté :**

Salle de traite : Fermée Partiellement fermée* Ouverte
 (* ex : 3murs et pas de plafond)

Fréquence de nettoyage : Après chaque traite 1 fois/jour Moins souvent

Méthode de nettoyage : Balayage à sec Humide Autres

Propreté générale avant l'entrée des chèvres : Présence de paille et souillure importante
 Quelques pailles et souillures
 Quasi absence de pailles et souillures

◆ Ambiance :

Bâtiment fermé : Oui Non

Système de ventilation actif : Oui Non

Courants d'air
 (mamelle et gueule de l'animal) : Oui Non

Odeur d'ammoniac : Oui Non

Sensation de confinement : Oui Non

Lumière : Suffisante Insuffisante

VI.2. Organisation de la traite :

Nombre de place en salle de traite:.....

Nombre de faisceau trayeur :.....

◆ Les trayeurs :

Nombre de trayeurs :.....

Organisation du chantier de traite : Satisfaisant Non satisfaisant

Les main sont elle lavées : Oui Non

Port de vêtements spéciaux : Oui Non

Point d'eau proche de la salle de traite : Oui Non

◆ Organisation de la traite :

Chèvre infectée en dernier : Oui Non

Temps de traite moyen :.....

Calcul sur une moyenne de 3 quais de traite :

Pour 1 quai : (heure de fin de traite – heure débute de traite) / nombre de chèvres

◆ Observation pendant la traite :

Les chèvres rentrent-elle facilement : Oui Non

Y a t'il beaucoup de paille dans la SDT* : Oui Non

Intervention pour positionner les chèvres : Oui Non
si oui : très fréquemment fréquent peu fréquent

Elimination des premiers jets Oui Non

Réalisation d'un nettoyage de la mamelle avant pose des gobelets : Oui Non

Si oui, type de nettoyage: A sec Humide

Fréquence : Systématique Non systématique

L'ambiance de traite est-elle calme : Oui Non

◆ Technique de traite :

Pose des manchons correcte : Oui Non

Y a t-il glissement de faisceaux : Oui Non Si oui,
nombre :.....

Y a t-il chutes de faisceaux : Oui Non Si oui,
nombre :.....

Egouttage machine avec massage: Oui Non

Dépose des manchons correcte : Oui Non

Dépose d'un gobelet avant l'autre : Oui Non

Palpation de la mamelle avant dépose : Oui Non

Dépose **après** coupure du vide : Oui Non

Coupure du vide entre 2 chèvres : Oui Non

Oui Non

Décrochage automatique :

Fonctionne toujours en automatique : Oui Non

◆ Entrées d'air :

* SDT = Salle De Traite

Entrée d'air lors de la dépose : Oui Non Si oui, nombre :....

Entrée d'air lors de l'égouttage : Oui Non Si oui, nombre :....

◆ Soins des trayons après dépose des gobelets

Soins apportés après la traite : Trempage Pulvérisation

Graisse Aucun

Si trempage, couleur du produit : Jaune (iodé) Vert (phyto) Bleu (acide)

VII Nettoyage de la machine à traire

Origine de l'eau de nettoyage :.....

L'eau est-elle analysée : Oui Non

Si oui, y a-t-il eu des problèmes ?
(précisez) :.....

Rinçage avant la traite : Oui Non

Avant nettoyage, procédez-vous à un poussage à l'eau : Oui Non

Type de nettoyage : Manuel Automatique Semi-automatique

Si manuel, durée :.....

Fréquence de nettoyage : Après chaque traite 1fois/jour Moins souvent

◆ Méthode de nettoyage :

rinçage initial Soir Matin

emploi de produit alcalin Soir Matin

emploi de produit acide Soir Matin

alternance régulière Soir Matin

fréquence de l'alternance:.....

Oui Non

Date :
Elevage :
Technicien :

Liste des points de contrôles efficacité nettoyage machine à traire

Points de contrôle	S	NS	Commentaires
Fin du lactoduc (raccord Tuyau/flexible)			
Terminal lait (bol réception lait)			
Papillon			
Piège sanitaire			
Purge			
Griffes			
Coupelles de lavage			
Positionnement coupelle (eau résiduelle)			
Bac de lavage (Présence éléments étrangers)			
Bouclage (lampe)			

pH EAU alimentation :
pH EAU Rinçage :
 Δ pH < 1,5

Nom Elevage :

TEMPÉRATURES DES LITIÈRES

Utilisation du thermomètre : la prise de température est effectuée à l'aide d'un thermomètre à sonde. Cette sonde est piquée droite dans la litière pour atteindre une profondeur de 10 cm maximum. Il faut attendre la stabilisation de l'affichage pour noter la mesure.

Localisation des mesures de température

Il est recommandé d'éviter les prises de température sur les travées de chaque côté du bâtiment, sur des zones où les animaux viennent de se coucher, ou encore à des endroits trop souillés par la présence d'un râtelier ou de passage fréquent des animaux.

Emplacement 1 :

1	2	3	4
5	6	7	8

Emplacement 2 :

9	10	11	12
13	14	15	16

Emplacement 3 :

17	18	19	20
21	22	23	24

Faire un plan de la chèvrerie (entrée /sortie et orientation bat/ positionnement de la salle de traite) et préciser les points de prélèvements.

Ne représenter que 3 emplacements maximum pour lesquels les conditions d'ambiance vous semblent les plus différentes (état des litières, aération, températures...).

Reporter les valeurs dans le tableau ci après

Date du curage avant la première mesure réalisée par le technicien :

Date curage entre J et J 20 :.....

Le curage entre J et J8 est à éviter

Une mesure doit être impérativement réalisée le premier jour de l'enquête (D₀) par le technicien et le jour de la collecte des échantillons de lait (D).

Dates prise T°	T°ext moyenne (3 points de mesure dans le bâtiment) - - -	T°ext moyenne (3 points de mesure dans le bâtiment) - - -
	D ₀ :..... T°Int	D :..... T°Int
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
10		
11		
12		
13		
14		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		

D0 : date de première mesure effectuée par le technicien le jour de l'enquête.

D : date de deuxième mesure effectuée lors de la collecte des échantillons.

Evaluation générale de l'exploitation (questions ouvertes)

Fabrication fromagère :

Accident de fabrication : Oui Non

Si oui, description des principaux accidents de fabrication rencontrés (stade de fabrication, pb pâte, croûte, arômes ...) :

Problème d'acidification : Oui Non

Si oui, fréquence :

Description :

Avez-vous observé des changements dans la qualité de vos fromages au cours de l'année ?
(Si oui, quand, fréquence)

Surveillez-vous régulièrement l'acidité ? (fréquence ?)

Quand avez-vous utilisé des ferments du commerce pour la dernière fois ? (pourquoi?)

Selon vous, existe-t-il des liens entre la qualité du lait et les pratiques d'élevage ?

Pour vous, qu'est-ce qu'un "bon lait" ?

Avez-vous d'autres informations à ajouter ? (besoins, attentes)

Annexe 2

Amplification par PCR des ADN en vue de l'analyse TTGE et DGGE

La région V3 de la région du gène codant pour l'ARN 16s est le substrat pour l'amplification par PCR.

1µl d'ADN est amplifié par deux amplifications successives avec l'appareil Gene Amp (modèle 2400 ; Perkin-Elmer, Courtabeuf, France).

Un fragment de 700 paires de bases incluant la région V3 est d'abord amplifié :

Le mélange réactionnel (100 µl) contient un tampon (10mM Tris-Hcl, 1,5mM de MgCL₂, 50mM KCL[concentrations finales]), chacun des deoxynucléoside triphosphate à une concentration de 200µM, 60 pmole des amorces W01(5'-AGA GTT TGA TC[AC] TGG CTC-3') et W012 (5'-TAC GCA TTT CAC C[GT]C TAC A-3'), 50ng d'ADN bactérien et 2,5 U de Taq polymérase (Q-BIOgène, Illkirch, France).

Le proGramme d'amplification est le suivant :

96°C, 4 min ; 30 cycles à 96°C pendant 10s, 50°C pendant 30s, 72°C pendant 1 min ; puis 72°C pendant 2 min.

La deuxième amplification se déroule de la façon suivante :

Le fragment de 700 paire de bases a été utilisé pour amplifier la région V3 avec les amorces suivantes : HDA1-GC (5'-**CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG** GAC TTC TAC GGG AGG CAG CAG T-3' ; le clamp GC est mis en gras) et HDA2 (5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA).

Le mélange réactionnel (100 µl) contient un tampon (10mM Tris-Hcl, 1,5mM de MgCL₂, 50mM KCL[concentrations finales]), chacun des deoxynucléoside triphosphate à une concentration de 200µM, 60 pmole des amorces, 1µl du fragment de 700 paire de bases amplifié et 2,5 U de Taq polymérase (Q-BIOgène, Illkirch, France).

Le proGramme d'amplification est le suivant :

96°C, 4 min ; 30 cycles à 96°C pendant 10s, 58°C pendant 30s, 68°C pendant 1 min ; puis 68°C pendant 7 min.

La taille et la quantité des produits PCR ont été déterminés par une électrophorèse avec du gel d'agarose (2%) (Seakem CTG agarose, TEBU, Le Perray en Yvelines, France).

Analyse TTGE

L'analyse TTGE a été réalisée en utilisant l'appareil 'Dcode universal mutation détection' (Bio-Rad) et les gels ont la dimension suivante : 16 cm x 16 cm x 1mm (épaisseur).

Les gels de polyacrylamide (8%) sont préparés et utilisés avec du tampon TAE 1X dilué à partir de tampon TAE 50 X (2 M Tris base, 1 M d'acide acétique glacial, 50 mM d'EDTA).

Ces gels sont préparés avec 8% (poids/volume) avec une solution d'acrylamide (acrylamide-bisacrylamide, 37,5 :1) et une concentration finale d'urée de 7M. Les gels TTGE sont standardisés en incluant un marqueur ciblant la région V3. Ce marqueur est constitué de 4 espèces de références (*Lactococcus garviae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Enterococcus faecalis* et *Lactococcus lactis*).

Les conditions concernant le déroulement de l'électrophorèse sont les suivantes :

41 V pendant 16 h avec une température initiale de 63°C et une température finale de 70°C (augmentation de la température : 0,4°C par heure).

5 µl des produits PCR sont déposés dans les puits. Pour éviter les effets de température hétérogène, les échantillons ne sont pas déposés dans les puits se situant sur les bords des gels. Un agitateur magnétique est utilisé pour mélanger le tampon et afin d'avoir une température homogène.

Après l'électrophorèse, les gels restent 15 min dans du bromide d'éthidium (0,5 µg/ml de tampon TAE 1X). Ils sont rincés pendant 20 min dans du tampon TAE 1X et photographiés sur une table UV.

Analyse DGGE

L'analyse DGGE a été réalisée en utilisant l'appareil 'Dcode universal mutation détection' (Bio-Rad) et les gels ont la dimension suivante : 16 cm x 16 cm x 1mm (épaisseur).

Les gels de polyacrylamide (8%) sont préparés et utilisés avec du tampon TAE 1X dilué à partir de tampon TAE 50 X (2 M Tris base, 1 M d'acide acétique glacial, 50 mM d'EDTA).

Ces gels sont préparés avec 8% (poids/volume) avec une solution d'acrylamide (acrylamide-bisacrylamide, 37,5 :1) contenant un gradient dénaturant de 40 à 70% d'urée et de formamide (un gradient dénaturant de 100% correspond à 7M d'urée et 40% [vol/vol] de formamide) dans du tampon TAE 1,25 X. Les gels DGGE sont standardisés en incluant un marqueur ciblant la région V3. Ce marqueur est constitué de 6 espèces de références (*Kytococcus sedentarius* CNRZ880, *Arthrobacter citreus* CNRZ928, *Kocuria kristinae* CNRZ872, *Bacillus pumilus* ATCC 7725, *Propionibacterium jensenii* Z87 et *Klebsiella oxytoca* ATCC 103437T).

Les conditions concernant le déroulement de l'électrophorèse sont les suivantes :

92 V pendant 16 h avec une température constante de 60°C.

5 µl des produits PCR sont déposés dans les puits. Pour éviter les effets de température hétérogène, les échantillons ne sont pas déposés dans les puits se situant sur les bords des gels. Un agitateur magnétique est utilisé pour mélanger le tampon et afin d'avoir une température homogène.

Après l'électrophorèse, les gels restent 15 min dans du bromide d'éthidium (0,5 µg/ml de tampon TAE 1X). Ils sont rincés pendant 20 min dans du tampon TAE 1X et photographiés sur une table UV.

Analyse des gels

Les photographies des gels sont converties en format file image pour analyse en utilisant le logiciel GelCompar (Applied Maths). Ce logiciel standardise les profils TTGE ET DGGE pour minimiser les différences de migration entre les gels. Environ 135 souches pour correspondants à 48 espèces ou sous-espèces sont intégrées dans la base de données.