



HAL
open science

IMPACT DE L'ESSUYAGE DES FROMAGES SUR L'AÉROSOLISATION DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DANS LES CAVES D'AFFINAGE EN CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

R Fantelli, Céline Delbès, P Battais, Sullivan Lechêne, P Duquenne

► **To cite this version:**

R Fantelli, Céline Delbès, P Battais, Sullivan Lechêne, P Duquenne. IMPACT DE L'ESSUYAGE DES FROMAGES SUR L'AÉROSOLISATION DES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DANS LES CAVES D'AFFINAGE EN CONDITIONS EXPÉRIMENTALES. Congrès Francophone de l'Allergologie (37ème édition du CFA), Association Française d'Etudes et de Recherches sur les Aérosols (ASFERA), Mar 2024, Paris, France. 10.25576/ASFERA-CFA2024-38939 . hal-04823725

HAL Id: hal-04823725

<https://hal.science/hal-04823725v1>

Submitted on 18 Dec 2024

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

IMPACT DE L'ESSUYAGE DES FROMAGES SUR L'AEROLISATION DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LES CAVES D'AFFINAGE EN CONDITIONS EXPERIMENTALES

R. Fantelli^{*1-2}, C. Delbès², P. Battais¹, Sullivan Lechêne¹, P. Duquenne¹

¹Laboratoire d'Analyses Spatiales et Temporelles des Expositions Chimiques, INRS, 54519 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France

²Unité Mixte de Recherche sur le Fromage, INRAE d'Aurillac, 15000 Aurillac, France

*Courriel de l'orateur : reshad.fantelli@inrs.fr

TITLE

Impact of cheese wiping on the aerolization of microbial community in ripening cellars under experimental conditions

RESUME

Une expérimentation a été conduite dans des caves d'affinage de fromages expérimentales (INRAE, Aurillac) dans le but de mesurer l'impact de l'essuyage des fromages sur l'aérolisation des micro-organismes pour, ainsi, mieux comprendre comment les communautés microbiennes des caves d'affinage se dispersent d'environnements en environnements. Des prélèvements ont été effectués dans différents environnements (air, paroi des caves d'affinage, toiles de jute utilisées pour essuyer les fromages et croûtes de fromage). Les résultats montrent que les prélèvements d'air effectués durant les essuyages des fromages présentaient des niveaux de moisissures plus élevés (7 LogUFC/m³ d'air) que ceux réalisés sans essuyage (2-3 LogUFC/m³ d'air). Par ailleurs, les concentrations en moisissures mesurées sur les parois de chaque cave d'affinage a très légèrement augmenté au cours de l'affinage (2-3 LogUFC/m² à 4-5 LogUFC/m²). Ces résultats suggèrent que les micro-organismes aérolisés durant les essuyages se seraient déposés sur les parois. Les analyses des communautés microbiennes, en cours de traitement, permettront de mettre en évidence les liens entre les différents environnements et ainsi contribuer à mieux connaître les mécanismes d'émission et de transmission des micro-organismes.

ABSTRACT

An experiment was conducted in experimental cheese maturing cellars (INRAE, Aurillac) with the aim of measuring the impact of cheese wiping on the aerosolization of microorganisms in order to better understand how microbial communities from ripening cellars disperse from environments to environments. Samples were taken in different environments (air, walls of maturing cellars, cloths used to wipe cheeses and cheese rinds). The results show that air samples taken during cheese wiping had higher levels of molds (7 LogUFC/m³ of air) than those taken without wiping (2-3 LogUFC/m³ of air). Furthermore, the molds' concentrations measured on the walls of each maturing cellar were very slightly increased during maturing (2-3 LogUFC/m² to 4-5 LogUFC/m²). These results mean that the microorganisms aerosolized during wiping would be deposited on the walls. The analysis of the microbial communities, currently being processed, will be able to highlight the links between the different environments and thus contribute to better understanding the mechanisms of emission and transmission of microorganisms.

MOTS-CLÉS: cave d'affinage expérimentale, fromage, moisissures, mécanismes d'émission

KEYWORDS: experimental ripening cellar, cheese, molds, spreading mechanism

1. INTRODUCTION

La production fromagère se caractérise par trois grandes étapes principales: la coagulation, le moulage et l'affinage. Lors de l'étape d'affinage, les fromages tout juste démoulés sont entreposés dans des caves à environnement contrôlé (température, hygrométrie et ventilation). Durant cette étape, la maturation se poursuit grâce à l'activité des micro-organismes qui, en consommant les nutriments du fromage (lipides et protéines notamment) vont contribuer à la libération d'arômes et à la production de gaz (Kongo et Malcata (2016); Blaya et al (2018); Acerbi et al (2020)).

Afin de mener à bien cette étape d'affinage, des opérateurs (affineurs) réalisent des soins spécifiques à la technologie fromagère (lavage avec de la saumure, brossage, essuyage à sec, etc...)

Or, des études ont démontré des liens entre certaines pathologies respiratoires chez les opérateurs, (tel que l'asthme, pneumopathie d'hypersensibilité, allergies, etc...) et l'exposition aux moisissures dans le milieu de la fromagerie (Eduard, 2009; Guglielminetti et al (2000); Molina et al (1977)).

Cependant, la compréhension des flux des communautés microbiennes ainsi que les mécanismes d'émission au sein des caves d'affinage sont très peu documentés.

L'étude présentée ici consistait donc à réaliser une expérimentation dans des caves d'affinage en conditions contrôlées dans le but de comprendre l'impact de l'essuyage des fromages sur la dispersion de micro-organismes afin d'implémenter les connaissances sur les mécanismes impliqués dans l'émission et les expositions associées ainsi que sur les flux des communautés microbiennes.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Dimensionnement des caves

Trois caves de dimensions identiques pour un volume total de 12,3 m³ ont été mises en oeuvre pour l'expérimentation (Figure 1). Chaque cave dispose d'un conditionneur (Floor-Mounted Air conditioners, Air Quality Process – Safrair France). Une gaine textile synthétique microperforée reliée à chaque conditionneur assure l'homogénéisation de l'atmosphère dans les caves par des mouvements circulaires de l'air. Les valeurs consignes (Ventilation = 5%; Température = 9°C; Humidité = 97%) du conditionneur et du système de renouvellement d'air ont été paramétrées via des logiciels. Le renouvellement d'air dans les caves s'appuie sur un système d'ouverture et de fermeture de vannes. Dans le cadre de l'expérimentation, le renouvellement d'air a été assuré en laissant les vannes ouvertes pendant 10 minutes et fermées pendant 60 minutes. Par conséquent, pour épurer totalement l'air des caves, il faudra attendre 5 cycles de renouvellement d'air.

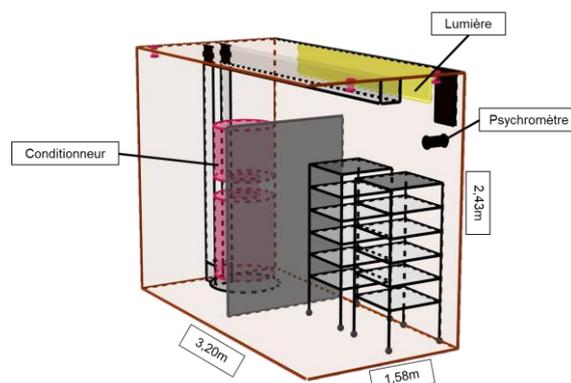


Figure 1: Organisation des caves expérimentales à l'INRAE d'Aurillac.

2.2. Schéma expérimental

Dans le but d'évaluer l'impact de l'essuyage de fromages AOP Saint-Nectaire sur l'aérolisation des micro-organismes dans l'air, une expérimentation a été conduite sur 4 semaines d'affinage (du 12 avril 2023 au 12 mai 2023) dans trois caves d'affinage expérimentales (INRAE, Aurillac) préalablement décontaminées.

Chacune des caves a été utilisée selon différentes conditions (Figure 2). La cave 1 contenait 12 fromages non-affinés (cave 1, FNA) Ces fromages ont été essuyés et retournés chaque semaine durant toute la durée de l'expérimentation.

La cave 2 contenait deux lots de fromages : un lot constitué de 6 fromages non-affinés (cave 2, FNA) qui ont été essuyés et retournés et un second lot constitué de 6 fromages affinés (cave 2, FA) et retournés, sans être essuyés. Enfin, la cave 3 a reçu un premier lot de 6 fromages non-affinés (cave 3, FNA) et un second lot de 6 fromages affinés (cave 3, FA) qui ont tous été essuyés et retournés. Chaque lot de fromage a été disposé sur des claies en acier, avec 2 fromages du même état d'affinage sur un même étage de la claie (Figure 1). Dans les caves 2 et 3, les fromages non-affinés ont été placés à proximité du conditionneur et les fromages affinés à proximité de l'entrée de la cave.

L'essuyage des fromages a été effectué une fois par semaine sur une période de 4 semaines. La première semaine, l'essuyage des fromages non-affinés dans les trois caves a été effectué avec des toiles de jute (25 cm x 25 cm) stérilisées et imbibées de saumure (densité = 1200), alors que les fromages affinés de la cave 2 ont été essuyés avec des toiles de jute stérilisées à sec.

Au cours des semaines 2, 3 et 4, tous les fromages ont été essuyés avec des toiles de jute stérilisées à sec. Chaque fromage a été essuyé pendant 15 secondes soit 5 secondes par face (dessus, côté et dessous).

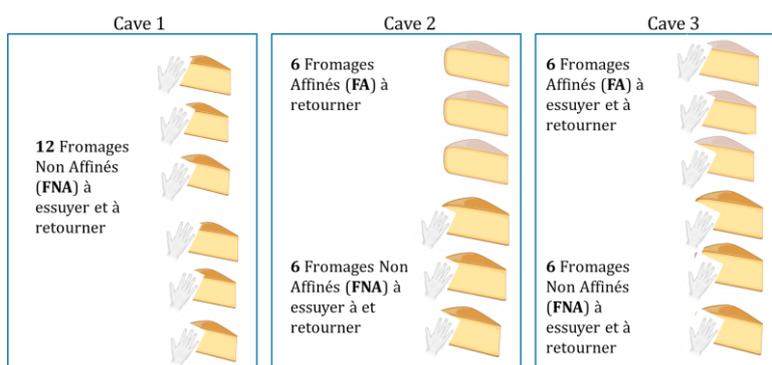


Figure 2: Disposition des fromages Saint-Nectaire dans les caves d'affinage expérimentales (INRAE, Aurillac)

2.3. Stratégie de mesures

Au cours de ces quatre semaines d'expérimentation, plusieurs matrices ont été prélevées : *i*) l'air dans l'environnement de chacune des caves, au cours des périodes d'essuyage et hors périodes d'essuyage, *ii*) à la surface des parois murales de chacune des trois caves, *iii*) des toiles de jutes ayant été utilisées pour essuyer les fromages et *iv*) des croûtes de fromages (Figure 3).

Les micro-organismes cultivables de l'air ont été collectés à l'aide de cassettes porte-filtre fermées (polypropylène, 37mm de diamètre) contenant un tampon support et une membrane en polycarbonate stérile avec diamètre 0,8µm (Millipore, France). Ces dernières ont été reliées à une pompe (Gilian 5000,

Sensidyne, USA) avec un débit moyen de 2L/min. Les durées de prélèvement ont été comprises entre 118 et 223 min (médiane = 182 minutes). Les micro-organismes cultivables des parois de chaque cave ont été collectés par frottage de quatre écouvillons (EnviroSwab 3MTM®) imbibés de Phosphate Buffered Saline (PBS) sur trois surfaces de 30 cm x 30 cm sur chaque paroi. Les micro-organismes des toiles de jutes ont été collectés via le filtrat obtenu après malaxage de ces dernières dans 150 mL de PBS au stomacher® (Interscience). Enfin les micro-organismes des croûtes de fromages ont été collectés à partir de 10g de croûtes finement rapées. Les grands groupes microbiens (bactéries, levures et moisissures) ont été dénombrés après incubation des milieux de culture pendant 72 heures à 25 ou 30°C. Ces milieux de culture plus ou moins sélectifs selon la composition vont permettre de quantifier les micro-organismes cultivables (flore totale, moisissures, levures, bactéries d'affinage...).

Par ailleurs, l'analyse des communautés microbiennes a été réalisée par metabarcoding via le séquençage à haut débit (HTS) de fragments de gènes marqueurs de l'ARN ribosomal 16S et ITS. Les amplicons ont été séquencés à l'aide de la technologie Illumina MiSeq.

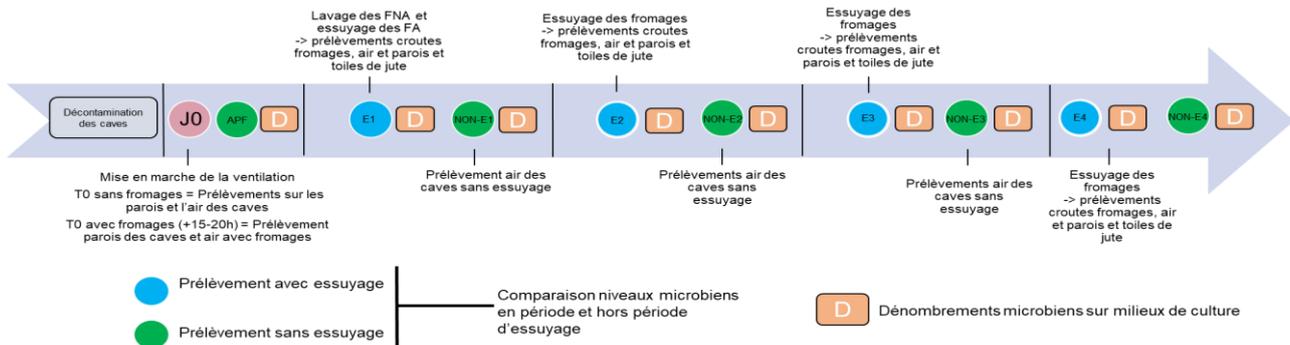


Figure 3: Organisation des étapes de prélèvement durant les périodes d'essuyage et hors périodes d'essuyage

Les traitements statistiques ont été réalisés avec le logiciel R Une analyse de la variance (ANOVA) a été effectuée sur les variables microbiologiques.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

La Figure 4 présente l'évolution des concentrations en moisissures dans l'air des trois caves au cours de l'affinage des fromages pendant et hors période d'essuyage.

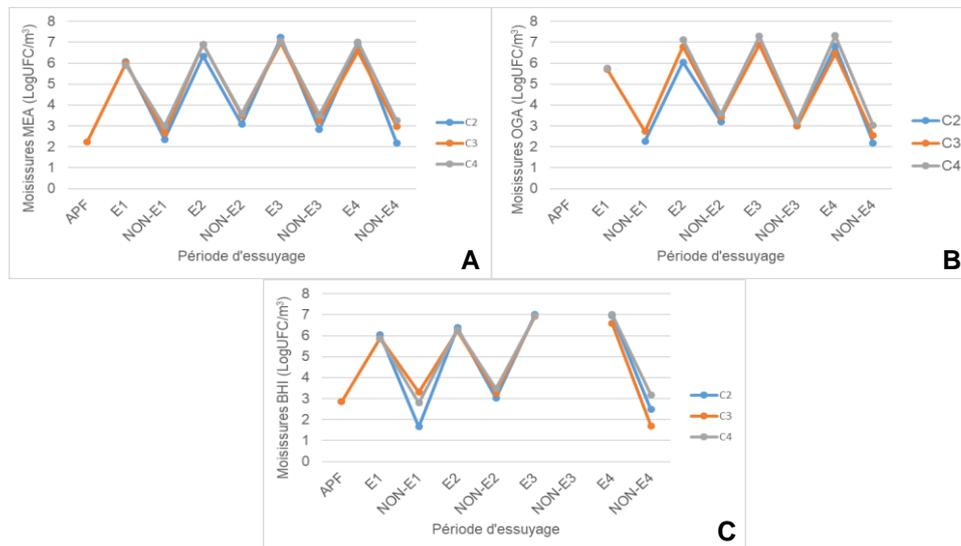


Figure 4: Evolution des niveaux de moisissures (en LogUFC/m³) issus des prélèvements d'air en période d'essuyage et hors période d'essuyage. **A**: Dénombrements sur milieu MEA. **B**: Dénombrements sur milieu OGA. **C**: Dénombrements sur milieu BHI.

Légende: APF: Air après dépôt des fromages; E1: Essuyage 1 (J8); NON-E1: Semaine 1 sans essuyage (J12). (*) Absence de valeurs due à une contamination des milieux de culture

Tableau 1: Effets des caves, de l'essuyage et du temps sur les concentrations en moisissures

Variables	Caves				Essuyage			Semaines d'essuyage					
	1	2	3	p-value	NON	OUI	p-value	APF	S1	S2	S3	S4	p-value
OGA_m	3,97	3,76	2,74	NS	2,14	5,52	***	0	2,74	5,03	3,90	4,72	*
MEA_m	4,25	4,31	4,11	NS	2,60	6,66	***	0,75	4,33	5,05	5,15	4,83	*
BHI_m	3,82	3,87	4,18	NS	2,14	6,51	***	0,95	4,26	4,77	4,18	4,65	NS

Signific. codes: '***' 0,001 '**' 0,01, '*' 0,05 '.' 0,1 'NS' 1 according to ANOVA test

Les concentrations en moisissures de l'air mesurées durant les essuyages ont atteint des niveaux élevés, compris entre 6 et 7 Log Unité Formant Colonies (UFC/m³) (Figure 4). Ces valeurs semblent être en accord avec deux études antérieures (Simon et Duquenne (2014); Duquenne et al (2021)). Dans ces deux études, des prélèvements d'air avaient été réalisés dans des entreprises qui produisent et affinent du fromage. Ces études avaient pour objectif d'évaluer le niveau d'exposition des opérateurs en fonction de leur poste. Ils ont démontré que certains opérateurs comme les laveurs ou les sélectionneurs de fromages étaient les personnes les plus exposées (avec des niveaux supérieurs à 10⁷ UFC/m³) (Simon et Duquenne (2014); Duquenne et al (2021)).

Les concentrations en moisissures de l'air mesurées sans essuyage des fromages (APF, NON-E1, NON-E2, NON-E3, NON-E4) ont été plus faibles avec des valeurs comprises entre 2 et 3 Log UFC/m³ (Figure 4). Des concentrations sont similaires à celles mesurées dans l'air à l'intérieur et l'extérieur de l'entreprise (10³ et 10⁴ UFC/m³) dans l'étude de Simon et Duquenne (2014). Ces faibles niveaux en micro-organismes sont supposés être retrouvés dans des environnements sans sources de moisissures (Simon et Duquenne (2014)). Durant les quatre semaines d'affinage, les niveaux de moisissures mesurés durant les essuyages ont été significativement bien plus supérieurs à ceux des prélèvements hors essuyage (+4 LogUFC/m³, P<0,001) (Tableau 1). Les semaines où les fromages ont été essuyés ont contribué à une aérolisation des moisissures dans l'air plus importante que lors du dépôt des fromages dans les caves. En revanche, aucune différence significative n'a été observée en fonction des conditions d'affinage des fromages dans les caves (Tableau 1).

Les concentrations en moisissures sur les croûtes de fromages ont très légèrement diminué au cours de l'affinage passant de 7-8 LogUFC/g de fromage la première semaine d'essuyage à 6-7 LogUFC/g en fin de période d'affinage (Figure non-présentée). En effet, au cours de l'affinage les paramètres physico-chimiques (pH, A_w...) évoluent entraînant un changement des équilibres microbiens (Picque et al (2009)). Les concentrations en moisissures mesurées sur les toiles de jute ont été stables au cours de l'affinage avec des valeurs autour de 6-7 LogUFC/mL (Figure non-présentée). Une très légère augmentation des concentrations en moisissures a été observée pour les prélèvements des parois des caves, passant de 2-3 LogUFC/m² la première semaine à 4-5 LogUFC/m² en fin d'affinage (Figure non-présentée). Cette augmentation peut être issue des nombreux essuyages réalisés dans les caves au cours de l'affinage. L'analyse des communautés microbiennes des différents environnements nous permettra de voir si les micro-organismes présents sur les parois sont bien issus des croûtes de fromages.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'étude proposée ici a mis en évidence l'impact important de l'essuyage de fromages AOP Saint-Nectaire au cours de l'affinage sur l'aérolisation des moisissures dans l'air. Nous supposons que ces micro-organismes ont été mis en suspension dans l'air avec l'essuyage des fromages et se sont déposés sur la surface des parois des caves soit par sédimentation soit par les flux d'air. Les analyses des communautés microbiennes sont en cours de traitement. Les résultats seront présentés ultérieurement et permettront de visualiser les flux des communautés microbiennes dans les différents environnements. L'étude des mécanismes d'émission des micro-organismes en conditions contrôlées sont en cours sur différentes technologies fromagères (actuellement sur l'AOP cantal et plus tard fromages à pâtes persillées). Ces données étant limitées à des caves expérimentales, elles seront implémentées avec des prélèvements obtenus dans des caves en conditions réelles dans des fromageries industrielles et permettront ainsi déterminer si les caves expérimentales sont des bons modèles pour expliquer les phénomènes de flux microbiens.

5. REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mathilde Lacalmontie, Béatrice Desserre, René Lavigne, François Allegretti, Anna Grizon, Lise Alonso, Esther Monnoyer, Nathalie Monta pour leur aide technique.

6. REFERENCES

- Acerbi, F., Guillard, V., L. H. McSweeney, P., Risbo, J., Guillaume, C., & Gontard, N. (2020). Origine et devenir des gaz dissous dans le fromage. *Science et Technologie Des Aliments*, 3(1). <https://doi.org/10.21494/ISTE.OP.2021.0677>
- Duquenne, P., Simon, X., Monta, N., Alonso, L., Coulais, C., Kunz, J., & Galland, B. (2021). Caractérisation des émissions et des expositions aux agents chimiques et biologiques dans locaux d'une entreprise fromagère. <https://doi.org/10.25576/ASFERA-CFA2021-24827>
- FIL-IDF 94 B, 1991. Lait et produits laitiers. Dénombrement des levures et des moisissures. Comptage des colonies à 25°C.
- Guglielminetti, M., Valoti, E., Cassini, P., Taino, G., & Caretta, G. (2001). Respiratory syndrome very similar to extrinsic allergic alveolitis due to *Penicillium verrucosum* in workers in a cheese factory. *Mycopathologia*, 149(3), 123-129. <https://doi.org/10.1023/A:1007293109657>
- Kongo, J. M., & Malcata, F. X. (2016). Cheese: Chemistry and Microbiology. In *Encyclopedia of Food and Health* (p. 735-740). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00135-5>
- Molina, Cl., Tourreau, A., Aiache, J.-M., Brun, J., Jeanneret, A., & Roche, G. (1977). Manifestations allergiques chez les fromagers étude clinique, épidémiologique et immunologique. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 17(5), 235-245. [https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(77\)80017-8](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(77)80017-8)
- Picque, D., Guillemin, H., Mirade, P. S., Didienne, R., Lavigne, R., Perret, B., Montel, M. C., & Corrieu, G. (2009). Effect of sequential ventilation on cheese ripening and energy consumption in pilot ripening rooms. *International Dairy Journal*, 19(9), 489-497. <https://doi.org/10.1016/j.idairy.2009.03.005>
- Simon, X., & Duquenne, P. (2014). Assessment of Workers' Exposure to Bioaerosols in a French Cheese Factory. *The Annals of Occupational Hygiene*. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meu027>
- Smid, T., Schokkin, E., Boleij, J. S. M., & Heederik, D. J. J. (1989). Enumeration of viable fungi in occupational environments: a comparison of samplers and media. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 50(5), 235-239. <https://doi.org/10.1080/15298668991374570>