

Control of *Listeria* contamination on the surface of semi-hard cheeses by natural ecosystems and protective cultures

Doctoral Thesis

Author(s):

Roth, Emmanuelle

Publication date:

2009

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-006092580>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Control of *Listeria* contamination on the surface of
semi-hard cheeses by natural smear ecosystems
and protective cultures

A dissertation submitted to

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
(ETHZ)

For the degree of
Doctor of Sciences

Presented by
Emmanuelle Roth

Dipl. Ing. Chim. EPF

Born June 5, 1981

Citizen of Buchholterberg, BE

Accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Christophe Lacroix, examiner
Dr. Elisabeth Eugster-Meier, co-examiner
Prof. Dr. Knut J. Heller, co-examiner
Prof. Dr. Leo Meile, co-examiner

Zurich, 2009

Summary

Listeria monocytogenes is the causative agent of listeriosis, a foodborne disease that provokes life-threatening infections in elderly, pregnant, newborn and immunocompromised populations. Post-production contamination of smear cheeses with *L. monocytogenes* occurs frequently, even in production facilities maintaining good hygienic standards, because of the extensive handling required during the ripening process. The microbial mat developing on the surface of smear cheeses during ripening creates a favorable environment to support *L. monocytogenes* growth. Biopreservation is a promising natural food preservation technique based on the application of microorganisms exhibiting antimicrobial properties, or barrier effects, or of their purified antimicrobial metabolites. The aim of this thesis was therefore to examine new biopreservation strategies for the control of *Listeria* contamination on the surface of semi-hard smear cheese. The anti-listerial properties, population dynamics and mechanisms of two natural smear ecosystems (chapter 2 and 3) were studied and compared with the *in situ* anti-listerial effects of three protective cultures producing broad spectrum bacteriocins (chapter 4) during ripening of Raclette type cheese at pilot scale.

In the first experimental part of this work, anti-listerial activities and population dynamics of two complex smear ecosystems (called F and M), isolated from commercial Raclette type cheeses, were investigated during the ripening process of Raclette cheeses artificially contaminated with *Listeria innocua* at 10-100 cfu cm⁻², using cultivation and Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE), a culture-independent method (chapter 2). The two consortia exhibited strong anti-listerial properties *in situ* over the whole ripening period of 60 to 80 days. TTGE revealed a similar sequential development of nine species common to both smears (F and M). Beside common cheese surface bacteria, the two consortia contained marine lactic acid bacteria that developed early in ripening (day 14), shortly after

the growth of staphylococci (day 7). In addition, the genus *Facklamia* was shown for the first time in cheese.

We then tested in the second part of this work the *in situ* anti-listerial properties of 29 bacterial strains isolated from smear ecosystem F (chapter 3). A control flora, consisting of 6 common species of smear cheeses exhibiting no anti-listerial activity, was inoculated on the surface of both control and test cheeses artificially contaminated with *Listeria innocua* at 50 cfu cm⁻². Application of different combinations of 3, 12 or 20 isolates in addition to the control flora on test cheeses led to a reduction of 1 to 4 log of *Listeria* growth after 15 days ripening. The highest inhibition was observed on cheese treated with 3 Facultative Anaerobic Halophilic and Alkaliphilic (FAHA) species, i.e. the two marine lactic acid bacteria *Alkalibacterium kapii* ALK 6 and *Marinilactibacillus psychrotolerans* ALK 9, and *Facklamia tabacinasalis* ALK 1. TTGE confirmed the growth of the 3 species to dominant level between 11 and 22 days of ripening, suggesting that the initial part of the *in situ* inhibition exerted by consortium F may be linked to the development of these species in early ripening period.

In the third experimental part, we evaluated the application of one pre- and two post-treatments of bacteriocin-producing lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* growth on smear cheeses (chapter 4). *Pediococcus acidilactici* UL5 producing pediocin PA-1 revealed the highest *in situ* anti-listerial activity, followed by *Lactobacillus plantarum* SM71 producing plantaricin SM71. In contrast, *Lactococcus lactis* UL719, a nisin Z producer, enhanced *Listeria* growth by 1 log compared to a control cheese. Complete inhibition was achieved by *Ped. acidilactici* UL5 and *Lb. plantarum* SM71 after early *Listeria* contamination at day 3, i.e. at low pH on cheese surface (pH 5.5), while only a short term inhibition was observed when *Listeria* contamination occurred at day 7, corresponding to a higher pH on the cheese surface of 6.8. This short term inhibition was correlated with a low stability of protective cultures' cell counts and bacteriocin activity. Repeated applications of protective

cultures affected the natural flora, inducing a delay in development of *Al. kapii*, *Agrococcus casei*, *Enterococcus* sp. and *Psychrobacter* sp., as shown by TTGE. As the natural flora contributes to organoleptic properties and safety of the cheese, this impact may limit use of repeated application of *ex situ* produced bacteriocins.

This research provided a broad basis for the development of high potential biopreservatives to control *Listeria* on the surface of semi-hard smear cheeses by the application of either natural antagonistic smear ecosystems or protective cultures. Application should nevertheless be carefully assessed in order to avoid changes in the natural flora that provoke negative impacts on organoleptic properties and barrier effects of the surface flora.

Résumé

Listeria monocytogenes est la bactérie responsable de la listériose, une maladie d'origine alimentaire qui provoque des infections potentiellement mortelles chez les personnes âgées, les femmes enceintes, les nouveau-nés et les personnes immuno-déprimées. Du fait des soins constants que nécessite leur affinage, la surface des fromages emmorgés est fréquemment contaminée par *Listeria monocytogenes*, y compris dans les unités de productions qui maintiennent de hauts standards d'hygiène. Le tapis microbien qui se développe à la surface des fromages emmorgés pendant l'affinage crée des conditions favorables à la croissance de *Listeria monocytogenes*. La biopréservation est une technique prometteuse de préservation naturelle des aliments basée sur l'application de microorganismes présentant des propriétés antimicrobiennes ou des effets barrières, ou encore de leurs métabolites antimicrobiens sous une forme purifiée. Le but du présent doctorat était d'examiner de nouvelles stratégies de biopréservation pour le contrôle des contaminations de *Listeria* à la surface des fromages emmorgés à pâte mi-dure. Les propriétés anti-listeria, les dynamiques de population et les mécanismes de deux écosystèmes naturels de morge ont été étudiés (chapitres 2 et 3) et comparés aux effets anti-listeria exercés *in situ* par trois cultures protectrices productrices de bactériocines à large spectre d'inhibition (chapitre 4), au cours de l'affinage de fromages de type Raclette à l'échelle pilote.

Dans la première partie expérimentale de ce travail, les activités anti-listeria et les dynamiques de population de deux écosystèmes complexes de morge (appelés F et M), isolés de fromages à Raclette industriels, ont été étudiés pendant le processus d'affinage de fromages artificiellement contaminés avec *Listeria innocua* à une concentration de 10-100 cfu cm⁻² (chapitre 2). L'étude a été effectuée par des méthodes classiques de culture et par analyse TTGE (Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis), une méthode culture-indépendante. Les deux consortiums ont montrés un puissant effet anti-listeria *in situ* pendant

une période d'affinage allant de 60 à 80 jours. L'analyse TTGE a révélé un développement séquentiel similaire des neuf espèces communes aux deux morges (F et M). En plus des bactéries typiques des fromages emmorgés, les deux consortiums contenaient des bactéries lactiques d'origine marine qui se sont développées tôt dans l'affinage (après 14 jours), peu après la croissance des staphylocoques (7 jours). De plus, le genre *Facklamia* a été détecté pour la première fois en milieu fromage.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons testé *in situ* les propriétés anti-listeria de vingt-neuf souches de bactéries isolées de l'écosystème de morge F (chapitre 3). Une flore contrôle, comprenant 6 espèces typiques des fromages emmorgés ne présentant aucune activité anti-listeria, a été inoculée à la surface de fromages tests et contrôles contaminés artificiellement avec *Listeria innocua* à une concentration de 50 cfu cm⁻². L'application sur les fromages tests de différentes combinaisons de 3, 12 et 20 souches en supplément de la flore contrôle a conduit à une réduction de la croissance de *Listeria* après 15 jours d'affinage allant de 1 à 4 log. L'inhibition la plus importante a été observée sur le fromage traité avec 3 espèces facultatives anaérobies halophiles et alcaliphiles (FAHA), soit les deux bactéries lactiques d'origine marine *Alkalibacterium kapii* ALK 6 et *Marinilactibacillus psychrotolerans* ALK 9, ainsi que *Facklamia tabacinassalis* ALK 1. L'analyse TTGE a confirmé la croissance des 3 espèces qui sont devenues dominantes entre 11 et 22 jours d'affinage. Ces données indiquent que la partie initiale de l'inhibition *in situ* exercée par le consortium F pourrait être liée au développement de ces trois espèces tôt dans l'affinage.

Dans la troisième partie expérimentale, nous avons évalué l'effet anti-listeria de bactéries lactiques productrices de bactériocines, appliquées comme cultures protectrices à trois reprises pendant l'affinage sur les fromages emmorgés, soit un pré- et deux post-traitements (chapitre 4). La souche *Pediococcus acidilactici* UL5 productrice de pédiocine PA-1 a montré la plus haute activité anti-listeria, suivie par la souche *Lactobacillus plantarum* SM71

productrice de plantaricine SM71. A l'inverse, la souche *Lactococcus lactis* UL719 productrice de nisine a favorisé la croissance de *Listeria* (1 log), comparé au fromage contrôle. Une inhibition totale a été obtenue avec *Ped. acidilactici* UL5 et *Lb. plantarum* SM71 après une contamination précoce de *Listeria* après 3 jours d'affinage, correspondant à un pH bas de 5.5 à la surface, alors que seule une inhibition à court terme a été obtenue lorsque la contamination a eu lieu après 7 jours d'affinage, correspondant à un pH plus élevé à la surface de 6.8. Cette inhibition à court terme était corrélée avec une faible stabilité des cultures protectrices, démontrée par une forte diminution des comptes microbiens ou des activités de bactériocine au cours de l'affinage. L'analyse TTGE a révélé que des applications répétées de cultures protectrices induisent une perturbation de la flore naturelle, en retardant le développement des espèces *Al. kapii*, *Agrococcus casei*, *Enterococcus* sp. et *Psychrobacter* sp. Etant donné que la flore naturelle contribue aux propriétés organoleptiques et à la sécurité du fromage, cet impact pourrait limiter l'application répétée de bactériocines produites *ex situ*.

La présente recherche a permis de poser des bases de travail solides pour le développement d'agents conservateurs naturels à haut potentiel pour le contrôle de *Listeria* à la surface des fromages emmorgés à pâte mi-dure, que ce soit par l'application d'écosystèmes antagonistes de la morge, ou par des cultures protectrices. Les futures applications devront néanmoins être optimisées de manière à éviter les perturbations de la flore naturelle, qui peuvent avoir des impacts négatifs sur les propriétés organoleptiques et les effets barrières de la flore de surface.

Zusammenfassung

Listeria monocytogenes ist der Erreger der Listeriose, einer Infektionskrankheit, die meist mit dem Verzehr von Lebensmitteln assoziiert wird. Vor allem bei älteren Menschen, Schwangeren, Neugeborenen und immunkomprimierten Menschen kann diese Krankheit ein lebensbedrohliches Ausmass annehmen. Eine Kontamination von geschmierten Käsen mit *L. monocytogenes* nach der Herstellung und somit während der Reifung ist ein häufiges Problem, sogar in Produktionsstätten mit hohen Hygienestandards. Eine Ursache dafür liegt in den zahlreichen manuellen Behandlungen, die während der Käsureifung stattfinden. Der mikrobielle Rasen, der sich auf der Oberfläche von geschmierten Käsen entwickelt, bildet eine für das Wachstum von *L. monocytogenes* optimale Umgebung. Die Biokonservierung ist eine Erfolg versprechende, natürliche Methode der Lebensmittelkonservierung. Sie basiert auf der Anwendung von antimikrobiell wirkenden Mikroorganismen, die gleichzeitig auch eine Barrierewirkung darstellen können, oder deren antimikrobiellen Stoffwechselprodukte in gereinigter Form. Die Zielsetzung dieser Doktorarbeit war es, neue Strategien für eine Biokonservierung von Oberflächen von geschmierten Halbhartkäsen zu entwickeln, um damit das Wachstum von Listerien kontrollieren zu können. Antilisterielle Eigenschaften, Populationsdynamiken und die Mechanismen von zwei natürlichen Schmiere Ökosystemen wurden dazu untersucht (Kapitel 2 und 3) und mit antilisteriellen Effekten von drei Bakteriozin bildenden Schutzkulturen *in situ* während der Käsureifung von Raclette Käsen verglichen (Kapitel 4).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden antilisterielle Aktivitäten und die Populationsdynamiken von zwei komplexen Schmiere Ökosystemen (F und M genannt) während der Reifung von Raclette Käse untersucht. Die beiden Schmierer waren vorgängig von kommerziellen Raclette Käsen isoliert worden. Während der Reifung wurden die Käse künstlich mit $10\text{-}100$ KBE cm^{-2} kontaminiert. Die Entwicklung der Mikroorganismen auf der Oberfläche wurde

sowohl mittels klassischer Kultivierungsmethoden als auch mit einer vom Zellwachstum unabhängigen Methode, der Gelelektrophorese mit zeitlichem Temperaturgradienten („Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis“; TTGE), verfolgt (Kapitel 2). Beide Konsortien hatten während der gesamten Reifung von 60 bis 80 Tagen starke antilisterielle Eigenschaften *in situ* auf der Käseoberfläche. Die TTGE zeigte eine ähnliche sequentielle Entwicklung von 9 Spezies, die in beiden Schmierarten (F und M) vorkamen. Neben typischen Käseoberflächenbakterien entwickelten sich in beiden Konsortien im Frühstadium der Reifung (14. Tag), kurz nach dem Wachstum der Staphylokokken (7. Tag), auch Meeres-Milchsäurebakterien. Zusätzlich konnte zum ersten Mal das Genus *Facklamia* auf Käse nachgewiesen werden.

In der Folge testeten wir in einem zweiten Teil *in situ* die antilisteriellen Eigenschaften von 29 Bakterien, die wir aus dem Schmiere Ökosystem F isoliert hatten (Kapitel 3). Eine Kontrollflora bestehend aus 6 typischen Schmiere-Spezies ohne antilisterielle Aktivität wurde dabei auf die Oberflächen eines Kontroll- sowie verschiedener Testkäse appliziert. Die Kontroll- und Testkäse wurden zusätzlich künstlich mit 50 KBE cm^{-2} *L. innocua* kontaminiert. Die Verwendung von verschiedenen Kombinationen von 3, 12 oder 20 Isolaten zusätzlich zur der Kontrollflora führte auf den Testkäsen nach einer 15-tägigen Reifung zu einer Listerien-Reduktion um 1 bis 4 Log. Die stärkste Hemmung konnte auf Testkäsen beobachtet werden, die mit 3 fakultativ anaeroben, halophilen und alkaliphilen (FAHA) Spezies behandelt worden waren. Dies waren, die zwei Meeres-Milchsäurebakterien *Alkalibacterium kapii* ALK 6 und *Marinilactibacillus psychrotolerans* ALK 9, sowie *Facklamia tabacinasalis* ALK 1. Mit Hilfe von TTGE konnte schliesslich während des 11. und 22. Reifungstages das Wachstum dieser drei Spezies bis hin zu einem dominanten Bereich gezeigt werden. Es kann daher vermutet werden, dass die anfängliche

Listerienhemmung die durch das Konsortium F *in situ* beobachtet worden war, mit der Entwicklung dieser Spezies während der frühen Reifung zusammenhängt.

Im dritten Teil evaluierten wir schliesslich die Anwendung von Bakteriozin bildenden Milchsäurebakterien in Form von Schutzkulturen gegen Listerien-Wachstum auf geschmierten Käsen (Kapitel 4). *Pediococcus acidilactici* UL5, ein Pediocin PA-1-Produzent, zeigte *in situ* die stärkste antilisterielle Aktivität, gefolgt von *Lactobacillus plantarum* SM71, dem Produzenten von Plantaricin SM71. Im Gegensatz dazu förderte der Nisin Z-Produzent *Lactococcus lactis* UL719 das Listerienwachstum, was zu einer um 1-Log erhöhten Zellzahl auf dem Testkäse im Vergleich zum Kontrollkäse führte. Eine komplette Hemmung wurde dann erreicht, wenn *Ped. acidilactici* UL5 und *Lb. plantarum* SM71 nach einer frühen Listerien-Kontamination am 3. Tag appliziert wurden. Zu diesem Zeitpunkt hatte die Käseoberfläche einen relativ tiefen pH Wert von 5.5. Eine nur kurzfristige Hemmung wurde erzielt, wenn die Listerien Kontamination am 7. Tag stattfand. Der pH-Wert der Käseoberfläche war dann mit 6.8 höher. Diese kurzfristige Hemmung korrelierte mit einer schwachen Stabilität der Keimzahlen der Schutzkulturen und auch der Bakteriozin-Aktivität. Eine wiederholte Applikation von Schutzkulturen beeinflusste die natürliche Oberflächenflora und führte zu einer Verzögerung der Entwicklung von *Al. kapii*, *Agrococcus casei*, *Enterococcus* sp. und *Psychrobacter* sp., was mittels TTGE gezeigt werden konnte. Da die natürliche Oberflächenflora massgeblich zu den organoleptischen Eigenschaften und auch zur Sicherheit von Käse beiträgt, könnte dieser negative Einfluss die repetitive Applikation von Schutzkulturen einschränken.

Unsere Forschung bietet eine breite Basis für die Entwicklung von äusserst potentiellen biologischen Konservierungsmitteln zur Kontrolle von Listerien auf der Oberfläche von geschmierten Halbhartkäsen. Dies kann einerseits durch die Applikation von natürlichen antagonistischen Schmiere Ökosystemen oder mit Hilfe von Schutzkulturen erreicht werden.

Jede Anwendung sollte dabei sehr genau evaluiert werden, um jegliche Veränderungen der natürlichen Flora und daraus resultierende negative Einflüsse auf die organoleptischen Eigenschaften und auf die Barrierewirkung ausschliessen zu können.