

FERMENTATIONS BUTYRIQUES – TOUJOURS D'ACTUALITÉ

Formation continue des fromagers



Sommaire

1	Introduction	3
2	La fermentation butyrique	3
3	Détermination de la fermentation butyrique	4
3.1	Méthodes	4
3.2	Les sources d'acide butyrique dans le fromage	4
3.3	Prélèvements d'échantillons de fromage pour analyses	6
4	Charge en sporulés du lait cru	6
4.1	Sporulés présents dans le lait	6
4.2	Sources de contamination	8
4.3	Mesures pour minimiser la charge en sporulés du lait	8
4.4	L'eau comme source de contamination	9
5	Influence de la technologie fromagère sur la fermentation butyrique	10
6	Détermination des spores butyriques dans le lait	10
6.1	Les méthodes	10
6.2	Les méthodes pratiques	10
6.3	Exactitude et répétabilité des méthodes qualitatives	13
6.4	Exigences au lait de fromagerie (pâtes dures)	14
7	Surveillance de la charge en spores du lait	15
7.1	Analyses régulières	15
7.2	Échantillons congelés	15
7.3	Valeur de preuve des échantillons de mélange ou ponctuels	15
7.4	Concept de prélèvement	15
7.5	Prélèvement et stockage des échantillons	16
8	Visites d'étables	17
9	Résumé	17
10	Littérature	18

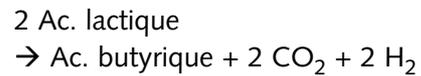
1. Introduction

La fréquence de l'apparition de fermentations butyriques dans les fromages à pâte dure est en augmentation. [1]. Depuis longtemps déjà, on constate que la fermentation butyrique peut se manifester aussi bien en été qu'en hiver. Face à la pression économique grandissante à laquelle sont soumis les producteurs et les utilisateurs de lait, les efforts en matière d'assurance qualité et de contrôles de la qualité du lait sont parfois négligés, alors que, depuis le relâchement des exigences en matière de production de lait de non-ensilage à fin 1998, c'est exactement le contraire qui est demandé.

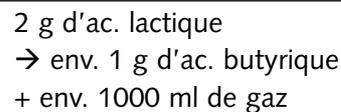
Comme la quantité de lait transformée par exploitation croît en raison de la restructuration des fromageries, les montants des dégâts provoqués par les fermentations butyriques augmentent et, avec eux, la pression exercée par assurances en matière de prévention s'élève.

2. La fermentation butyrique

La forme la plus courante de la fermentation butyrique, le gonflement tardif, est provoqué par l'espèce de sporulés *Clostridium tyrobutyricum*. Du point de vue biochimique, cette fermentation est décrite comme suit :



ou



Les premiers signes de fermentation butyrique sont généralement visibles après 6 à 10 semaines d'affinage. Cela se manifeste au travers d'un goût rance et, très souvent par un gonflement des fromages dû à une forte production de gaz. Si un fromage contient 1 mg d'acide butyrique d'origine fermentaire par kg, il contiendra environ 50 ml d'hydrogène insoluble (45 ml H₂/mmol d'ac. butyrique à pression normale).

Même lorsqu'ils ne présentent presque pas de modifications visibles, les fromages touchés par la fermentation butyrique sont pratiquement invendables. C'est pourquoi on peut qualifier *C/. tyrobutyricum* de véritable „destructeur de fromage“.



Illustration. 1
Fromages d'essais dépréciés par la fermentation butyrique

3. Détermination de la fermentation butyrique

3.1 Méthodes

Une fermentation butyrique peut se déterminer à l'aide des méthodes suivantes:

- Appréciation visuelle et sensorielle des meules
- Détermination microbiologique des clostridies dans le fromage
- Mesure de la quantité d'acide butyrique présente dans le fromage au moyen de la chromatographie en phase gazeuse ou liquide

L'appréciation visuelle et sensorielle nécessite que la fermentation butyrique ait déjà provoqué des modifications perceptibles dans les fromages. Elle est subjective et peu sûre au stade primaire de la fermentation butyrique.

La détermination bactérienne a également ses points faibles. En effet, les spores qui ont germé se développent très localement et forment des colonies. Comme elles sont peu nombreuses, il est possible qu'un échantillon prélevé à la sonde ne contienne aucun germe. De plus, les germes végétatifs présents sont détruits lors de la préparation de l'échantillon.

La méthode la mieux appropriée pour la détermination d'une fermentation butyrique est la mesure de l'acide butyrique par chromatographie. Cet acide diffuse effectivement dans le fromage et il peut être détecté indépendamment de sa source qui est la colonies de clostridies. Le risque d'obtenir un résultat faussement négatif est ainsi fortement réduit.

3.2 Les sources d'acide butyrique dans le fromage

L'acide butyrique détecté sous forme volatile peut provenir de 3 origines différentes :

1. dégradation enzymatique de la matière grasse laitière (lipolyse)
2. dégradation d'acides aminés libres par la microflore du fromage (protéolyse)
3. fermentation butyrique (fermentaire)

La part d'acide butyrique produite par la lipolyse peut être estimée à partir de la quantité d'acide n-caproïque présente. En effet, la graisse de lait contient de l'acide butyrique et caproïque en proportion molaire de 2 :1. Dans un fromage rance, cette proportion avoisine 3:1 car il semble que l'acide butyrique soit libéré plus facilement que les autres acides gras.

La part d'acide butyrique libérée par la protéolyse peut être estimée grossièrement à l'aide de la quantité d'acide i-butyrique, sachant que les proportions libérées par ce processus sont équivalentes (1 :1).

La quantité d'acide butyrique volatile présente dans le fromage est le résultat approximatif de l'équation suivante:

$$n-C4_{\text{total}} [\text{mol/kg}] = 3 * n-C6 + i-C4 + n-C4_{\text{FB}}$$

sachant que

$n-C6$ = acide caproïque volatil en mmol/kg

$i-C4$ = acide i-butyrique volatil en mmol/kg

$n-C4_{\text{FB}}$ = acide butyrique fermentaire en mmol/kg

Un Gruyère de bonne qualité contient moins de 1.5 mmol/kg d'ac. butyrique volatil au moment de la pesée à environ 3,5 mois. Les valeurs au dessus de 1 mmol/kg d'ac. butyrique fermentaire ($n-C4_{\text{FB}}$) indiquent clairement une fermentation butyrique. (voir tabl. 1, et ill. 2).

Tab. 1: Acides gras volatils dans divers échantillons de Gruyère (exemples tirés des analyses de la consultation ALP)

Echantillons	A	B	C	D	E	F	G
Age [Mois]	4.0	8.0	6.5	2.5	2.5	3	3.4
Ac. gras volatils totaux	13.3	32.5	23.7	9.8	9.3	29.2	12.1
Ac. formique C 1	1.6	1.9	2.0	0.9	0.5	0.6	0.5
Ac. acétique C 2	9.5	25.4	13.9	7.1	6.6	6.9	6.7
Ac. propionique C 3	0.7	1.4	1.4	0.2	0.5	2.6	0.7
Ac. iso-butyriquei-C 4	0.2	0.6	0.1	0.1	0.0	0.1	0.2
Ac. butyrique n-C 4	0.8	1.7	4.6	1.3	1.6	18.8	3.1
Ac.iso-valérique i-C5	0.3	0.9	0.3	0.1	0.0	0.1	0.2
Ac.caproïque n-C 6	0.2	0.3	1.3	0.1	0.1	0.1	0.8
Ac. butyrique fermentaire	<0.5	<0.5	<0.5	0.7	1.3	18.5	0.6
	N	N	R	(FB)	FB	FB	R

Légende:

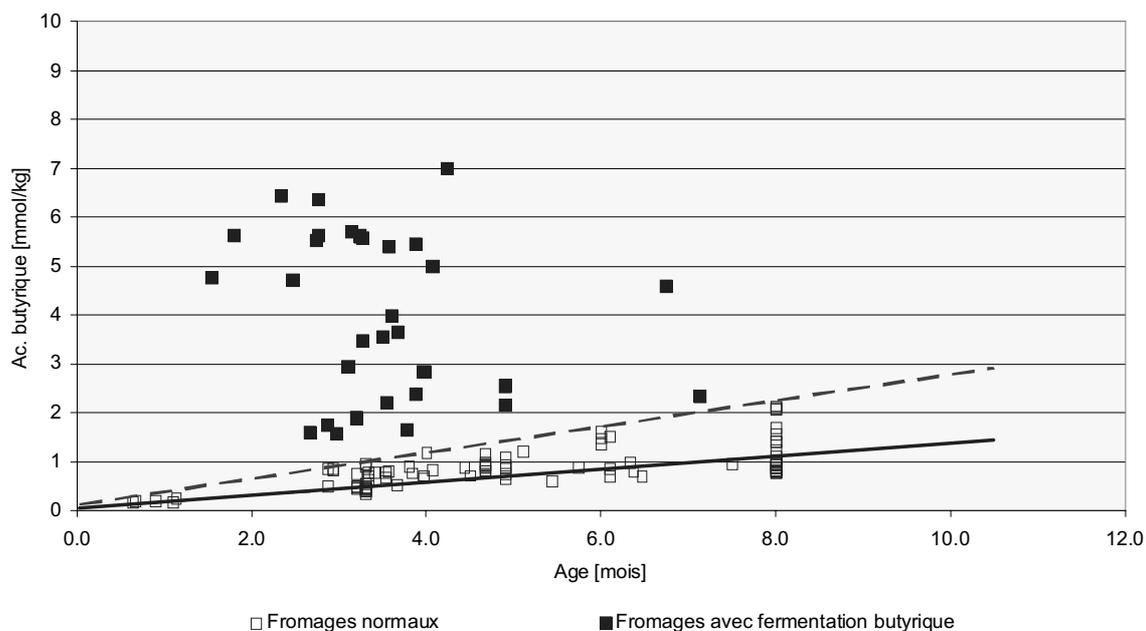
N = bonne qualité

R = fromages rance

FB = fromage avec fermentation butyrique

(FB) = fromages avec fermentation douteuse

Teneur en acide butyrique dans le gruyère



Ill. 2: Teneur en acide butyrique dans des échantillons de Gruyère. La ligne pleine montre l'évolution de la teneur en ac. butyrique durant l'affinage. Les valeurs en dessus de la ligne en traits-tillés proviennent de fromages dépréciés par la fermentation butyrique

3.3 Prélèvements d'échantillons de fromage pour analyses

L'analyse des acides gras volatils par chromatographie est relativement coûteuse (prix ALP : Fr. 70.- par échantillon). Il est par conséquent indiqué de prélever des échantillons en cas de présompt de fermentation secondaire seulement, en présence de lainures, grosses ouvertures, gonflement, rancidité. Etant donné que dans la plupart des cas, seules quelques productions journalières sont touchées par des fermentations butyriques, il n'est pas judicieux de prélever sur un grand mélange de meules.

Pour ces raisons, il est recommandé de prélever comme suit:

Groupe	Description	Analyse
A. Fromages défectueux	Lainures, grosses ouvertures, gonflement, rancidité	Echantillon de mélange
B. Fromages douteux	Qualité douteuse, dates proches des productions défectueuses	Echantillons des productions journalières
C. Fromages de qualité	Qualité sans défauts	Aucune ou éventuellement échantillon de mélange

Cette pratique comporte des risques:

1. Résultat faussement négatif en début de fermentation butyrique – les charges faiblement positives ne sont pas reconnues sous l'effet de dilution.
2. Surestimation des dégâts en présence d'un résultat positif obtenu sur un grand mélange, les productions sans défauts n'étant pas reconnues.

4. Charge en sporulés du lait cru

4.1 Sporulés présents dans le lait

Le lait, de part sa nature, est pratiquement stérile à la sécrétion, sauf en présence d'infections des mamelles. La contamination bactérienne débute au passage du canal du trayon. Cependant, les sources de contamination les plus importantes se trouvent à l'extérieur des mamelles, comme sur la peau des pis et des mamelles, dans les ustensiles de traite, les conduites à lait les ustensiles de stockage et de transport, l'air ambiant, la litière etc. Le spectre des germes contaminants est très large et, en matière de fermentation butyrique, ce sont les germes sporulés qui nous intéressent. (Tabl. 2).

Les **sporulés aérobies** (*Bacillus* spp.) sont largement présents dans les sols et dans l'eau, dans les fourrages et les fourrages en fermentation. Dans les fourrages séchés, où ils se trouvent sous forme sporulée, ils constituent la population bactérienne majoritaire.

Dans le fromage, on ne trouve pratiquement jamais de sporulés aérobies bien que la plupart d'entre-eux se développent en conditions anaérobies. En présence de lait fortement contaminé, ils sont capables de produire des défauts de goût du fromage au travers de leurs enzymes qui sont des protéases et des lipases puissantes.

Tab. 2: Bacilles sporulés dans le lait

Représentant	Propriétés					
	Croît en aérobiose	Croît en anaérobiose	Prod. de gaz	Form. d'ac. butyrique	Croît à < 10°C *	
Sporulés aérobies (Bacillus spp.)						
<i>B. cereus</i>	X	X	-	-	+/-	Pathogène et protéolytique
<i>B. licheniformis</i>	X	X	+/-	-	+/-	Protéolytique puissant
<i>B. polymyxa</i>	X	X	+	-	+	Protéolytique puissant
<i>B. pumilus</i>	X	X	-	-	+/-	Protéolytique et lipolytique puissants
<i>B. subtilis</i>	X	-	-	-	+/-	Strictement aérobie, protéolytique („Bacille du foin“)
Sporulés anaérobies (Clostridies)						
<i>Cl. butyricum</i>	-	X	++	+	-	Fermente le lactose et le lactate en ac. butyrique
<i>Cl. tyrobutyricum</i>	-	X	++	++	-	Agent de la fermentation butyrique classique
<i>Cl. beijerinckii</i>	-	X	(+)	(+)	-	Production d'ac. butyrique et de gaz (H ₂) in vitro
<i>Cl. sporogenes</i>	-	X	+++	+	-	Protéolytique et lipolytique puissant, producteur de CO ₂ , H ₂ , H ₂ S et NH ₃ . responsable de la pourriture blanche
<i>Cl. perfringens</i>	-	X	++	+	-	Pathogène (diarrhée)
<i>Cl. bifementans</i>	-	X	++	(+)	-	Protéolytique puissant, variétés pathogènes connues

* la croissance à < de 10°C est une spécificité de variétés

Les **sporulés anaérobies** (*Clostridium spp.*) ne peuvent survivre en milieu aérobie que sous la forme sporulée. C'est pour cette raison qu'ils ne se développent pas dans le lait et c'est ce qui les différencie de l'espèce *Bacillus*.

Les fermentations butyriques provoquées par **Clostridium butyricum** sont rares. Le danger existe cependant lors d'acidification déficiente et de fermentation incomplète du lactose, pour autant que le lait soit contaminé.

Cl. tyrobutyricum est considéré, au stade actuel des connaissances, comme le seul responsable des fermentations butyriques. 50 spores par litre de lait peuvent suffire à faire gonfler un fromage à pâte dure. [3].

Cl. beijerinckii et **Cl. bifementans** – sont tout comme *Cl. tyrobutyricum* – souvent présents dans les ensilages et dans le lait. Selon Guericke [9], *Cl. beijerinckii* serait la variété de clostridies la plus fréquemment présente dans le lait cru, mais apparemment sans signification comme agent du gonflement. Des chercheurs hollandais

[10] les ont cependant retrouvés dans des fromages à pâte mi-dure dépréciés par une fermentation butyrique. Ils seraient toutefois incapables de produire du gaz et de l'acide butyrique dans le fromage.

Cl. sporogenes, est la variété responsable de la *pourriture blanche des fromages*. Il s'agit d'un germe protéolytique puissant qui dégrade les acides aminés en hydrogène, CO₂, amines et composés soufrés. La pourriture blanche apparaît dans les fromages sous forme de taches claires ou de cuites grosses comme le poing qui dégagent une odeur et un goût putrides. Ce sont les fromages à affinage prolongé et avec un pH de la pâte supérieur à 5,3 qui sont les plus souvent touchés. La contamination du lait se fait par les mêmes voies que *Cl. tyrobutyricum* (voir 4.2).

La plupart des sporulés énumérés ci-dessus et pouvant se trouver dans le lait sont capables de se développer dans les conditions des analyses utilisées pour le dénombrement de *Cl. tyrobutyricum* et peuvent ainsi conduire à des résultats faussement positifs, respectivement à des valeurs trop élevées (voir 6.3).

4.2 Sources de contamination

Les clostridies se trouvent naturellement dans les sols et les eaux des lacs et des rivières. Dans les sols, la quantité de spores peut varier entre quelques milliers et plusieurs millions par gramme, suivant le type de fumure et d'exploitation appliquées. Les clostridies et spécialement les bacilles butyriques se multiplient partout où règnent des conditions anaérobies, en présence d'humidité et de matériaux organiques. On trouve de telles conditions dans les biotopes suivants :

- Fourrages ensilés, spécialement lors de mauvaise acidification et d'ensilages mouillés
- Fourrages en fermentation et restes de fourrages verts, pulpes de betteraves et de fruits
- Tas de fumier et de compost
- Bourbiers dans les aires de promenade et les pâturages
- Places mouillées sous les couches
- Eaux sales et stagnantes

Selon les sources de la littérature [4, 5], la teneur en sporulés des ensilages varie entre quelques centaines et un million de spores / gr. Un ensilage de qualité en contiendra généralement moins de 1'000, ce qui est suffisant pour contaminer le lait, en particulier si l'hygiène d'étable et de traite est insuffisante.

Les bouses de vaches contiennent jusqu'à 5 fois plus de sporulés anaérobies que le fourrage qu'elles ont ingéré, ce qui signifie qu'un enrichissement se produit dans le tube digestif. Pour cette raison, les particules d'excrément fixés aux mamelles et au pelage, ainsi que les couches, les vêtements et les mains souillés des trayeurs sont les sources de contamination les plus importantes.

L'illustration 3 montre l'évolution saisonnière de la charge du lait en sporulés anaérobies. Les valeurs sont très variables et peuvent à tous moments dépasser les limites supérieures.

Sporulés anaérobies dans les laits de chaudière
(Région FR-NE) 1999/2000

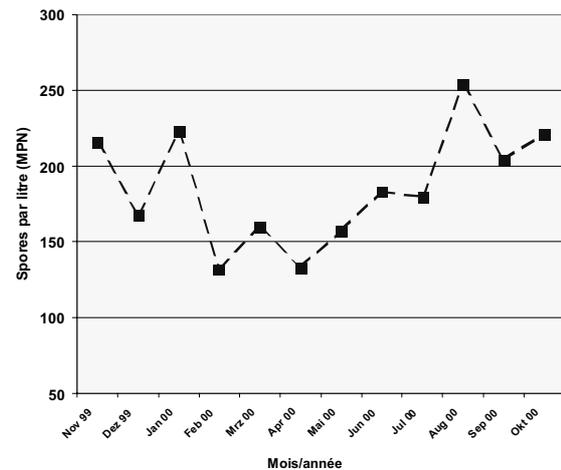


Illustration. 3: Variations saisonnières de la charge en sporulés anaérobies du lait (Source: SICL FR-NE)

4.3 Mesures pour minimiser la charge en sporulés du lait

Mesures pour diminuer l'apport de spores dans l'étable

- Éviter de souiller les fourrages verts avec de la terre
- Respecter les délais entre l'épandage d'engrais de ferme et la pâture
- Stocker les fourrages au propre et au sec
- Mettre les vaches qui changent de zone en quarantaine avant de les introduire dans le troupeau
- Bétonner les aires de promenade

Mesures pour diminuer la charge en spores dans l'étable

- Contrôler l'état des couches en caoutchouc et la propreté sous les caoutchouc
- Assurer la maintenance des crèches, des abreuvoirs et autres chars mélangeurs
- Distribuer des fourrages frais et de qualité – évacuer les restes

Mesures pour diminuer l'apport de sporulés dans le lait

- Évacuer les fumiers avant la traite
- Éviter la formation de poussière et d'éclabous
- Assurer la propreté du bétail
- Nettoyer soigneusement les trayons avant la traite (voir fiche „Préparation à la traite chez la vache laitière“ [13])

- Changer les habits sales des trayeurs
- Éviter de toucher avec des mains non lavées toutes surfaces entrant directement ou indirectement en contact avec le lait
- Poser les faisceaux trayeurs soigneusement, sans aspiration d'air

Mesures spéciales pour les producteurs de lait de fromagerie qui distribuent des ensilages au bétail non-laitier:

- Séparer strictement les aires de promenade
- Séparer strictement les pâturages, leurs accès et leur fumure
- Éloigner les silos et les balles d'ensilage des zones de passage des vaches laitières
- Éviter le transfert sans quarantaine d'animaux vers la production laitière
- Assurer le changement des habits, des souliers et le lavage des mains lors du passage à l'étable des vaches laitières



Illustration. 4 Des animaux et des couches propres sont les garants d'une production de lait peu contaminé en sporulés

En respectant minutieusement tous ces points, il est possible de produire du lait pauvre en spores. Une étude menée par ALP démontre que les échantillons de lait de silo ne contiennent pas forcément plus de spores, bien que les valeurs maximales soient plus élevées (tab. 3). Par ailleurs il est reconnu que les spores anaérobies provenant d'ensilages, habituées à se développer dans un milieu acide sont plus "dangereuses" pour la qualité du fromage.

	Moyenne géométrique [Spores/l]	Limite supérieure de l'intervalle de confiance 95% [Spores/l]
Avec ensilages (n=18)	50	350
Sans ensilages (n=18)	12.5	50

4.4 L'eau comme source de contamination

L'eau des réseaux publics ne devrait pas comporter de risques butyriques. Les contaminations sont souvent provoquées par de l'eau de sources privées. Le risque augmente lorsque des engrais de ferme sont épanchés dans la zone de captage d'une source, en période de fortes pluies ou

d'orages après une période sèche, spécialement dans les zones karstiques du Jura. Une attention particulière est à apporter à la qualité de l'eau dans les fromageries où elle est ajoutée au lait ou au caillé.

5 Influence de la technologie fromagère sur la fermentation butyrique

Il est reconnu depuis longtemps que le nombre de spores trouvées dans le lait n'est pas un indicateur très fiable en matière de fermentation butyrique dans le fromage. Les raisons sont les suivantes :

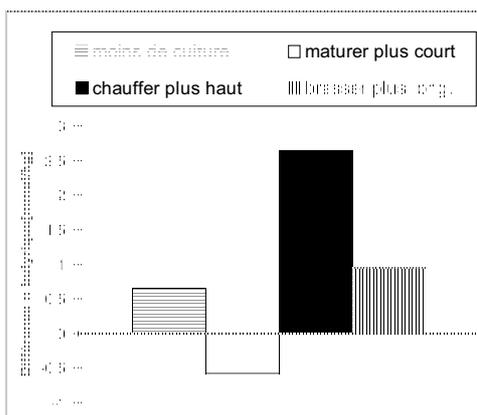
1. La détermination des spores est imprécise (voir 6.3)
2. Influence du processus de fabrication du fromage

La germination et la croissance des spores butyriques dépendent des facteurs suivants:

- Teneur en oxygène du milieu (potentiel rédox)
- Traitements thermiques du lait et du caillé
- Flore concurrente / cultures employées
- Valeur pH dans le fromage
- Teneur en cuivre et en sel dans le fromage
- Température et durée d'affinage

Les fromages à pâte dure sont particulièrement exposés à la fermentation butyrique en raison de la température de chauffage du caillé élevée à laquelle ils sont soumis et de l'affinage prolongé dont ils ont besoin. Des essais effectués par ALP ont démontré que : Les températures de chauffage du caillé supérieures à 54°C favorisent la germination des spores (Illustration 5). La durée de brassage après le feu agit de façon similaire mais l'effet est moins marqué. Une acidification lente est également un facteur favorisant, bien que, d'après Bachmann [3] elle n'accélère pas à elle seule la fermentation butyrique.

La teneur en sel du Gruyère ne suffit pas à inhiber la fermentation butyrique.



6 Mise en évidence des spores butyriques dans le lait

6.1 Les méthodes

Plusieurs méthodes sont actuellement utilisées pour déterminer les agents du gonflement dans le lait (Tabl. 4). Dans les laboratoires, c'est la méthode par filtration Bourgeois/Casey adaptée qui est la plus souvent utilisée (Illustration 6).

6.2 Les méthodes pratiques

Pour la détermination des spores butyriques à la fromagerie, les méthodes MRCM et ALP (test du fromager) peuvent être prises en considération.

Le test **MRCM** est un set commercialisé par Foodtech AG, Uster. Les éprouvettes stériles contenant le milieu nutritif et la paraffine sont relativement simples à l'emploi. 10 ml de lait sont injectés dans l'éprouvette à l'aide d'une seringue. L'échantillon est ensuite pasteurisé et incubé pendant 4 jours à 36°C. Une production de gaz et un changement de couleur de rouge au jaune indiquent une réaction positive. Ce test ne donne qu'un résultat qualitatif (positif / négatif) et la limite de détection se situe avec 10 ml de lait, à environ 100 spores par litre. C'est-à-dire que les résultats sont relativement peu sûrs (voir Tabl. 5). En ensemençant un lait sur 3 éprouvettes ou plus, il est possible d'abaisser la limite de détection et même de faire une interprétation quantitative du résultat selon le principe du nombre le plus probable (MPN).

Illustration.7: Influence de différents paramètres de fabrication sur la fermentation butyrique dans un Gruyère modèle de 90 jours [3]:

1. moins de cultures (0.8 au lieu de 2.5 %),
2. maturation courte (5 au lieu de 45 min.),
3. chauffage plus haut (58 au lieu de 54°C),
4. brassage final plus long (30 au lieu de 5 minutes)

Le test MRCM est également disponible en petit format à prix réduit. Ce modèle ne permet de tester qu'un ml de lait par éprouvette et la limite de détection devient beaucoup trop élevée pour la surveillance du lait de non-ensilage.

Certains fromagers contrôlent le lait de chaudière au moyen du test MRCM de 10 ml, 6 jours consécutivement et évaluent le résultat au moyen

d'une table MPN (exemple : 2 x positif et 4 x négatif donne un MPN de 41 spores/l)

La prudence est cependant de mise.

Comme chacun des 6 tests est réalisé avec un autre échantillon, le résultat obtenu peut devenir impossible à interpréter et les fortes contaminations ne seront pas reconnues comme telles.

Tab. 4: Méthodes usuelles pour la détermination des sporulés anaérobies dans le lait

	Principe	Indicateur de clostridies	Spécificité (producteurs de gaz détectés)	Avantages / inconvénients
Méthodes pratiques				
Lactofermentateur	Incubation aérobie à 38°C / 24h (pas de traitement thermique)	Formation de gaz	Coliformes y compris. E. coli Bacillus spp.	+ simple - non spécifique, clostridies non détectées - seulement qualitatif
Test de Weinzirl	Pasteurisation du lait à 83°C 15', incubation à 37°C/7j sous parafine	Formation de gaz	Spoires de clostridies et Bacillus spp.	+ simple + détecte les spores. - ne détecte pas Cl. tyrobutyricum (seul. Cl. butyricum)
Test MRCM ¹⁾	Set prêt à l'emploi avec milieu RCM modifié → past. 85°C/10-15min. incubation à 36°C/96h sous paraffine	Formation de gaz + changement de couleur	Spoires de clostridies Limite de détection: 100 spores/l	+ simple + détecte seul. les sporulés. - pas seul. les butyriques - rel. cher – Fr. 7.- par éprouvette
Test rapide ALP	30 ml de lait + ac.lactique → chauffé à 75°C/15min. incubation à 38°C/96h sous parafine	Formation de gaz	Spoires de clostridies et Bacillus spp. Limite de détection: 35 spores/l	+ rel. simple + détecte seul. sporulés - ne détecte pas seul. les B. butyriques - résultat qualitatif
Méthodes de laboratoire				
Méthode NIZO (Test Weinzirl modifié)	Milieu: Lait + glucose + ac. lactique (pH 5.45). Pasteurisation puis incub. 37°C/7j. Plusieurs éprouvettes par dilution	Formation de gaz	Spoires de clostridies et Bacillus spp. Limite de détection: 25 spores/l (40ml de lait)	+ rel. simple + détecte seul. sporulés - ne détecte pas seul. les B. butyriques - erreurs de lecture - longue
Méthode MPN	Éch. past.dans milieu Dextrose-p-d-t.. Incub. anaérobie 37°C/9j. Plusieurs éprouvettes par dilution	Formation de gaz	Spoires de clostridies et év. Bacillus spp. Limite de détection: 25 spores/l (40ml de lait)	+ rel. simple + détecte seul. sporulés - ne détecte pas seul. les B. butyriques - erreurs de lecture - longue
Méthode par filtration Bourgeois/Casey	Filtration des échantillons sur membrane après past. et trait. enzym. Incub. sur RCM-Agar (4j, 37°C)	Apparence des colonies Odeur	Spoires de bacilles butyriques Limite de détection: 25 spores/L	+ bonne sélectivité + bonne précision (en présence de fortes concentration) + rapide - seul. produits filtrables

¹⁾ Set commercial de Kemikalia AB, Lund (S); Distribué par Foodtech AG, 8610 Uster

Test rapide pour fromagers

Le test du fromager permet une bonne surveillance des Sporulés en fromagerie. Son exécution est décrite schématiquement ci-dessous dans l'illustration 5.

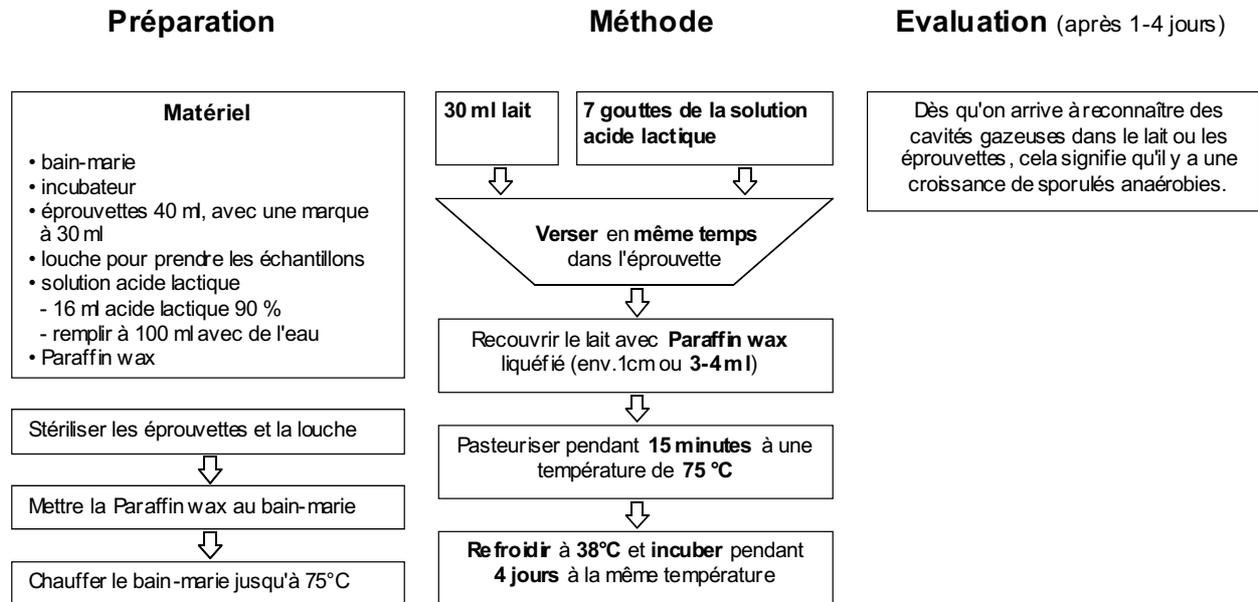


Illustration 5: Détermination des sporulés à l'aide de la méthode rapide ALP („Test du fromager“)

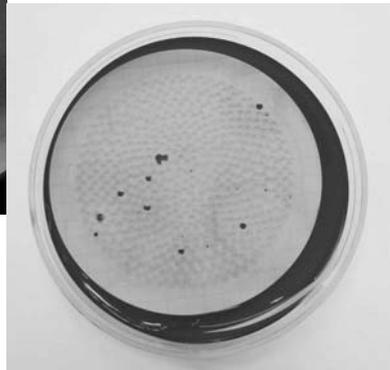
En effectuant le test du fromager il est important d'observer les 3 points suivants:

- 1. Pasteurisation:** les éprouvettes devraient être plongées dans le bain-marie jusqu'à la hauteur du niveau supérieur du lait, pour éviter que des germes végétatifs qui auraient survécu dans la zone non immergée, ne recontaminent pas le lait
- 2. Élimination:** les éprouvettes positives peuvent contenir jusqu'à 1 milliard de bacilles butyriques, c'est pourquoi il faut les stériliser avant de les vider (15 minutes dans une marmite à vapeur)
- 3. Contamination:** si du liquide s'écoule d'une éprouvette incubée, il faut se désinfecter les mains ainsi que la surface contaminée

Le test du fromager ne donne qu'un résultat qualitatif (positif / négatif). Comme la production de gaz dépend de la composition de la flore des sporulés, il n'est pas toujours possible de tirer un parallèle entre le début et l'intensité de la production de gaz et le nombre de spores présentes dans le lait.

Procédé MPN

Chaque méthode qui donne un résultat qualitatif y compris le test du fromager, peut être transformée en test quantitatif. En ensemençant un lait sur plusieurs éprouvettes simultanément et en utilisant une table de calcul MPN, on obtient le nombre le plus probable de spores présentes dans le lait en question. Le surplus de travail est relativement modeste et les documents utiles peuvent être téléchargés gratuitement sur Internet par ex. le MPN Calculator sous: <http://www.i2workout.com/mcuriale/mpn>.



Ill. 6: Gauche: Appareil de filtration pour le dénombrement de spores de *Cl. tyrobutyricum* dans le lait. Droite: Filtre à membrane après l'incubation.

6.3 Exactitude et répétabilité des méthodes qualitatives

Exactitude

La méthode par filtration (Ill. 6) permet de différencier *Cl. tyrobutyricum* des autres sporulés. Les méthodes MPN par contre dénombrent tous les sporulés capables de produire du gaz en conditions anaérobies. C'est pourquoi, ces méthodes donnent des résultats plus élevés et plus souvent faussement positifs. La fréquence de résultats faussement positifs dépend entre autres de la quantité d'échantillon analysé et de la limite de détection qui en découle. La table 5 démontre comment, purement statistiquement et indépendamment de la méthode, un lait analysé plusieurs fois donne un résultat faussement négatif 1 fois sur 8 (13%). Les méthodes MPN sont réputées plus sensibles en raison d'une meilleure croissance des sporulés anaérobies dans les milieux liquides.

Tab. 5: Probabilité d'obtenir des résultats négatifs en fonction du volume de lait analysé

Teneur en spores réelle des laits [spores/l]	Volume analysé*			
	10 ml	30 ml	40 ml	100 ml
	<100 spores/L	< 35 spores/L	< 25 spores/L	< 10 spores/L
25	78%**	43%	36%	7%
50	61%	22%	13%	0.5 %
75	47%	10%	5%	0.04 %
100	37%	5%	2%	<0.01 %

* 30 ml correspond au „Test du fromager“, 40 ml: au volume normal de la méthode MPN et de la méthode par filtration, 100 ml = volume maximal de la méthode par filtration.

** L'exemple ci-dessus montre qu'un lait contenant 25 spores/l, analysé sur 10 ml donne un résultat négatif 78 fois sur 100

Tabl. 6: Précision des méthodes quantitatives de détermination des sporulés anaérobies dans le lait (limites de confiance 95%)

	Méthode par filtration (avec 40 ml de lait)	Méthode MPN (3x4 dilutions: 6/0.6/0.06 ml)
Résultats	50 spores/l	150 spores/l
Limite inférieure de confiance	15 spores/l	46 spores/l
Limite supérieure de confiance	175 spores/l	520 spores/l

Précision

La méthode par filtration est plus précise car elle permet le comptage des colonies formées, alors que la méthode MPN donne toujours un résultat estimé. Comme on le voit dans le tableau 6, les 2 méthodes donnent des résultats relativement peu précis, surtout lorsque la teneur en spores se situe à proximité de la limite de détection des méthodes.

En résumé, il faut retenir que:

- La méthode MPN donne des résultats souvent 2 à 3 x supérieurs à ceux de la méthode par filtration. C'est la raison pour laquelle les limites de tolérance sont spécifiques aux méthodes.
- La méthode MPN donne plus de résultats faussement positifs, mais un peu moins de résultats faussement négatifs.
- Les résultats obtenus avec la méthode par filtration offrent un meilleur pronostic par rapport au risque butyrique, en raison de sa sélectivité.
- Les résultats obtenus avec la méthode MPN donnent un meilleur diagnostic de l'hygiène de la traite, tous les sporulés étant détectés.
- Les deux méthodes sont relativement peu précises pour détecter le seuil du risque de fermentation butyrique. C'est pourquoi, il est recommandé d'analyser régulièrement les laits pour obtenir une image plus claire des risques.

6.4 Exigences par rapport lait de fromagerie (pâtes dures)

Lorsqu'il quitte de la ferme, un lait de qualité irréprochable contiendra moins de 25 spores de clostridies par litre. A partir de 50 spores/l dans le lait de chaudière, le risque de fermentation butyrique augmente sensiblement. La fixation de valeurs limites en matière de sporulés pour le lait de producteur se fait généralement au travers de contrats de droit privé. Les limites usuelles se trouvent sur la table 7.

Tab. 7 : Limites usuelles en sporulés anaérobies pour le lait de fromagerie pour le Gruyère

	Limite (méthode par filtration)	Limite (MPN)	Limite „Test fromager“
Lait de chaudière	≤ 25 spores/l	14 spores/l	pas de gonflement
Lait de producteur	≤ 25 spores/l	200 spores/l	idem

7 Surveillance de la charge en spores du lait

7.1 Analyses régulières

L'analyse des sporulés du lait de chaudière et des laits de producteurs permet une détection précoce d'un risque butyrique et, le cas échéant, de prévenir des gros dégâts. C'est pourquoi ces analyses sont recommandées et elles peuvent être effectuées au moyen du test du fromager ou par un laboratoire. Leur fréquence sera adaptée à la situation et augmentée en cas de résultats positifs. En présence de résultats positifs à répétition, il faudra en rechercher les causes et y remédier.

7.2 Échantillons congelés

Les échantillons congelés permettent de remonter à la source d'un gonflement butyrique, en analysant les laits individuels ainsi conservés. Ils seront donc analysés le plus souvent en cas de fermentation butyrique après plusieurs semaines de congélation. Ils ne conviennent pas pour faire de la prévention, bien que les expériences faites par ceux qui pratiquent cette forme de prélèvements vont dans le sens d'une amélioration de la qualité du lait. Le prélèvement continu d'échantillons à congeler est laborieux et prend de la place dans le congélateur. C'est pourquoi il s'agit généralement de mélanges de plusieurs traites ou d'échantillons ponctuels.

7.3 Valeur de preuve des échantillons de mélange ou ponctuels

Des laits réputés de qualité insuffisante peuvent être mis à jour à l'aide d'échantillons de mélange ou ponctuels. La situation se complique lorsque des gonflements sporadiques se succèdent dans un laps de temps court.

- Les échantillons ponctuels sont, comme leur nom l'indique, prélevés de manière aléatoire. Si un gonflement apparaît à une date à laquelle il n'y a pas eu de prélèvement, leur valeur de preuve devient très limitée.
- Les échantillons de mélange peuvent être composés de traites chargées en spores et de traites de bonne qualité. Ils conviennent mieux

que les échantillons ponctuels pour découvrir le ou les producteurs fautifs, bien que la probabilité d'obtenir des résultats négatifs subsiste.

- Même en prélevant des échantillons chaque jour, les résultats des analyses usuelles n'auront jamais une valeur de preuve absolue.

7.4 Concept de prélèvement

La fréquence des prélèvements pour l'analyse des spores et pour la congélation doit être fixée selon une évaluation des risques butyriques et, le cas échéant, en tenant compte des conditions de l'assurance. De plus, les aspects saisonniers et spécifiques à l'exploitation, comme le nombre de producteurs, le mode de prélèvement, la dotation en personnel seront pris en compte. Faudra-t-il désormais prélever systématiquement ou aléatoirement et congeler des échantillons ? Là n'est pas la question. Le plus important est de ne pas s'en remettre au destin. Une façon de faire est décrite à l'illustration 8. Une pratique bien éprouvée consiste à mélanger les prélèvements de 4 traites et à congeler ce mélange, ce qui donne 15 échantillons par mois et par producteur. Un de ces échantillons est analysé au lieu d'être congelé.

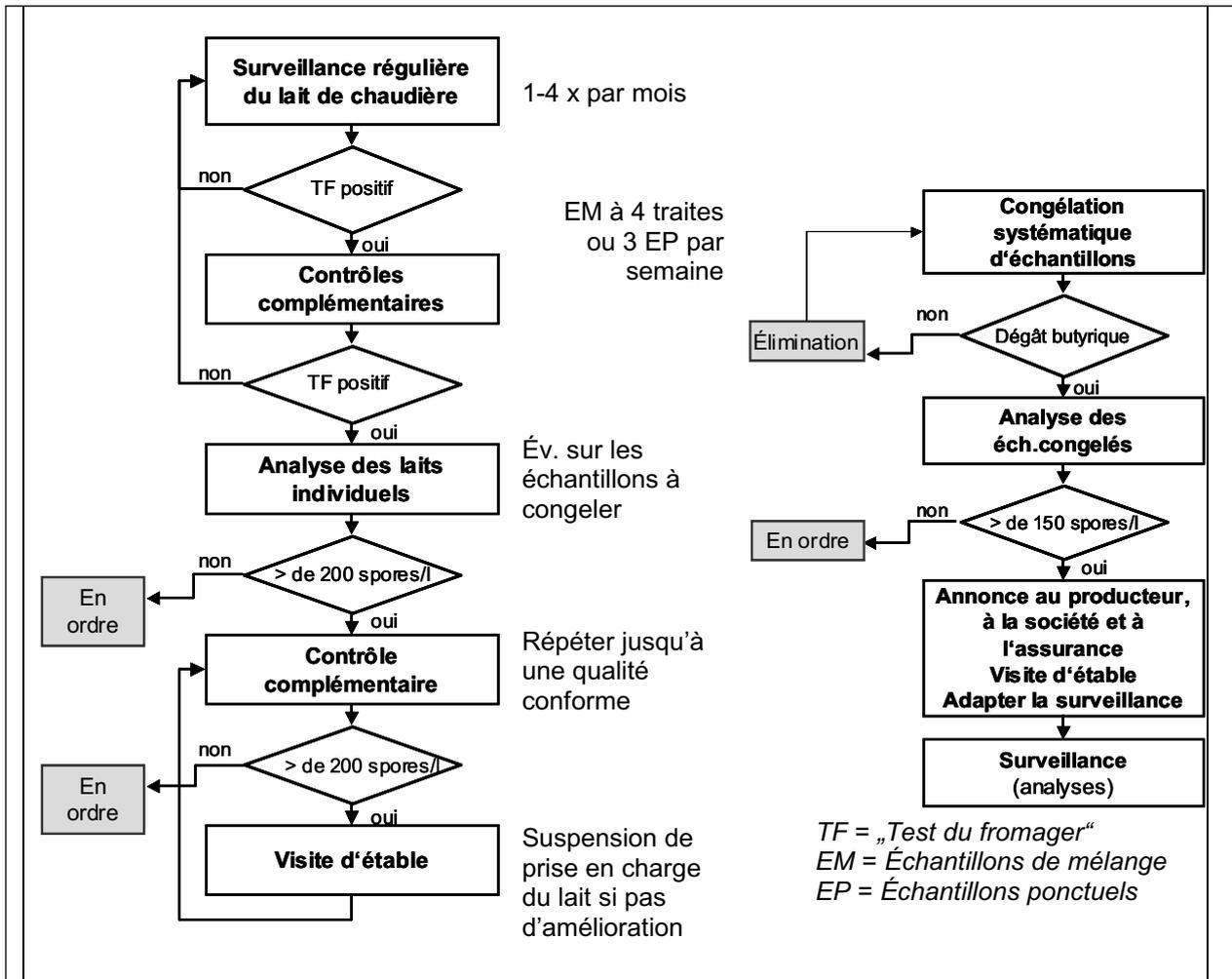


Abb. 7: Démarche possible pour la surveillance de la charge en sporulés au moyen d'analyses régulières (à gauche) et d'échantillons congelés (à droite)

7.5 Prélèvement et stockage des échantillons

Si l'on mélange les échantillons de plusieurs traites, il faudrait congeler ces derniers uniquement lorsque la dernière traite est prélevée pour éviter les décongélations successives. Celles-ci conduisent à une floculation du lait qui gêne le dénombrement des sporulés (homogénéité, filtration).

Les récipients suivants conviennent à la congélation:

- Bouteilles en **polypropylène** des fédérations d'élevage, 50 ml, incassables et résistantes à la congélation (ne pas trop les remplir).
- Sachets **PE** par exemple Whirl-Pak® ou SteriBag®, d'un coût de 20 – 30 ct. la pièce et d'un volume standard de 60 et 120 ml.

8 Visites d'étables

De nos jours, les visites d'étables sont moins fréquentes qu'autrefois. La très bonne qualité globale du lait semble justifier ceci. Cependant, du point de vue des contaminations par des sporulés, elles demeurent un élément indispensable à la prévention. En effet, la découverte de points faibles et leur élimination peuvent être assurées au travers d'une visite d'étable. Elles permettent ainsi de maintenir le dialogue avec les producteurs. La collaboration du conseiller de traite est souvent utile. Elles devraient avoir lieu pendant la traite et déboucher, le cas échéant, sur des accords concrets entre partenaires.

9 Résumé

La fréquence de l'apparition de fermentations butyriques est décelable de façon sûre dans le fromage au moyen de l'analyse des acides gras volatils. Un Gruyère de 4 mois avec une teneur en acide n-butyrique fermentaire supérieure à 1 mmol/kg peut être considéré comme un cas butyrique. L'agent responsable de la fermentation butyrique, *Cl. tyrobutyricum* est, dans la très grande majorité des cas, véhiculé par le lait. La responsabilité en matière de fermentation butyrique n'est cependant pas uniquement celle des producteurs de lait. En effet, le fromager peut apporter une pièce importante à l'édifice de la prévention en éduquant les producteurs, en contrôlant régulièrement la qualité du lait de mélange et des laits individuels et en prélevant des échantillons à congeler.

En raison des variations dues aux méthodes d'analyse et des écarts importants en matière de contamination, il est important d'effectuer des analyses régulières pour obtenir une image claire en termes de risques butyriques. Si le risque se confirme, il faudra augmenter la fréquence des analyses, effectuer des visites d'étables ciblées et éliminer les points faibles aux niveaux de l'hygiène de l'étable et de la traite.

En matière de fermentation butyrique, il vaut mieux agir que réagir!

10 Littérature

1. Anon. Buttersäurebakterien nehmen wieder überhand. *Alimenta* (2005) 1 (2), S. 21 2005.
2. Bachmann H.P.: Einflussfaktoren auf das Auskeimen und Wachstum von *Clostridium tyrobutyricum* in Hartkäse aus silofreier Milch. *Mitt.Lebensm.Hyg.* 90 (1) 62-72 (1999a)
3. Bachmann H.P.: Technologische Einflussfaktoren auf die Buttersäuregärung. *Agrarforschung*, 6 (4) 137-140 (1999b)
4. Bühler, N.B. "Clostridien in Silage, Dung, Milch und Käse - Spätblähung im Käse" ETH Diss. Nr. 7770 (1985)
5. Kalzendorf Ch. Clostridien-Sporen in der Rohmilch. Ursachen und Massnahmen zur Vermeidung des Sporeneintrages. *Milchpraxis* 34 (1) 38-41 (1994)
6. Anon: REGLEMENT relatif à l'utilisation de la marque de garantie SANS SILO du 10.09.2001. FROMARTE Schwarztorstrasse 26, 3001 Berne
7. Bachmann H.P., Häni J.P. Drei Wege für die Bildung von n-Buttersäure. *Schweizerische Milchzeitung* 123 (21), 7 (1997)
8. Walter Schaeren, Jürg Maurer, Werner Luginbühl, Heinz Sollberger, Georges Bühlmann, Marius Collomb, Marc Dalla Torre. *ALP intern* 2004, Nr 37 (2004)
9. Guericke S. Laktatvergärende Clostridien bei der Käseherstellung. *Deutsche Milchwirtschaft*. 48, 735-739, (1993)
10. Klijn N, Nieuwenhof F.F.J., Hoolwerf J.D., Van der Waals C.B., Weerkamp A.H. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (6) 2919-2924 (1995)
11. Anon: Manuel AQ, FROMARTE. Etat au 1.10.2003. FROMARTE Schwarztorstrasse 26, 3001 Berne
12. Dalla Torre M., Berger T. Bestimmung der Anzahl Sporen von *C. tyrobutyricum* und Buttersäurebazillen in Milch. *ALP science* 2004, Nr. 474. Agroscope Liebefeld-Posieux, 3003 Bern. (2004).
13. Ewy A. Préparation à la traite chez la vache laitière. *Revue UFA* 5/03. (2003). Source: Service sanitaire bovin, Eschikon 28, 8315 Lindau (www.rgd.ch/RGD.PDF/publikationen/melkvorbereitung_f_0510.pdf)

Editeur Agroscope Liebefeld-Posieux, Station fédérale de recherches en production animale et laitière (ALP), CH-3003 Berne, Tél. +41 (0)31 323 84 18, Fax +41 (0)31 323 82 27, www.alp.admin.ch, e-mail: info@alp.admin.ch
Auteurs Ernst Jakob, Jean-Pierre Häni, Tél. +41 (0)31 323 81 45, e-mail: ernst.jakob@alp.admin.ch **Photos/rédaction** Agroscope Liebefeld-Posieux **Mise en page** Olivier Bloch, Marc Wassmer **Copyright** Reproduction autorisée sous condition d'indication de la source et de l'envoi d'une épreuve à l'éditeur.

ISSN 1661-0660 / 06.01.2006