

LES FERMENTATIONS BUTYRIQUES ET LEURS ANALYSES

Groupes de discussion

Auteur

Ernst Jakob

Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP
CH-3003 Berne, daniel.wechsler@alp.admin.ch



Impressum

ISSN	1661-7619 / 07.04.2011
Editeur	Station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP Schwarzenburgstrasse 161, CH-3003 Berne Tél. +41 (0)31 323 84 18, Fax +41 (0)31 323 82 27 info@alp.admin.ch, www.agroscope.ch
Photos	ALP
Mise en page	RMG Design, CH-1700 Fribourg
Copyright	© 2011 ALP Reproduction autorisée sous condition d'indication de la source et de l'envoi d'une épreuve à l'éditeur.

Table des matières

1	Introduction	4
2	Agents sporogènes dommageables pour le fromage	4
2.1	Classification des clostridies dommageables pour le fromage	4
2.2	Origine et propriétés des clostridies	4
2.3	Clostridium butyricum	5
2.4	Clostridium tyrobutyricum	5
2.5	Clostridium sporogenes	6
2.6	Clostridium oceanicum	6
2.7	Clostridium botulinum	7
2.8	Importance des différents clostridies nuisibles pour les fermentations butyriques	7
3	Détection de fermentations défectueuses provoquées par des clostridies	8
3.1	Identification du défaut classique	8
3.2	Détection à l'aide du microscope	9
3.3	Détection à l'aide d'un milieu de culture	9
3.4	Détection d'acides carboxyliques volatils par chromatographie en phase gazeuse (GC)	10
3.5	Interprétation de l'analyse GC par rapport à la fermentation butyrique	11
3.6	Détection de l'agent responsable à l'aide d'une méthode de biologie moléculaire	12
4	Détermination de la teneur en spores du lait	14
4.1	Méthodes pratiques	14
4.2	Méthodes de laboratoire	14
4.2.1	Méthode NPP	14
4.2.2	Méthode NPP en Romandie (méthode CNERNA modifiée)	15
4.2.3	Echantillons de contrôle et marche à suivre en cas de dommage	16
4.2.4	Méthode de filtration selon Bourgeois & Casey	17
4.2.5	Comparaison des méthodes par rapport à la validité et l'incertitude de mesure	18
4.3	Analyse des spores de lait bactofugé	19
5	Résumé	20

1 Introduction

Les fermentations butyriques demeurent très répandues dans la pratique. Quant à savoir si, comme on le suppose parfois, on les rencontre de plus en plus souvent depuis la levée des zones d'interdiction de non-ensilage en 1999, cela est difficile à dire en raison du manque de statistiques. Nous pouvons cependant confirmer que, vu l'augmentation de la taille des exploitations, on enregistre aujourd'hui des dommages plus importants. Selon les déclarations des compagnies d'assurance offrant des couvertures contre les fermentations butyriques, les dégâts financiers ont considérablement augmenté au cours des dernières années. Cela signifie qu'une quantité plus importante de fromages a été touchée par des fermentations butyriques. L'évolution des dégâts peu réjouissante pour les compagnies d'assurances a eu pour conséquence que ces dernières exigent des clarifications plus détaillées en cas de dommage et sont plus exigeantes en matière de traçabilité et de prévention.

- *Clostridium beijerinckii*
- *Clostridium botulinum type E (psychrotrophe)*
- *Clostridium butyricum*
- *Clostridium tyrobutyricum*

2.2 Origine et propriétés des clostridies

Origine

C'est dans la terre que l'on trouve avant tout les clostridies. Dans des ensilages, les clostridies peuvent se développer en cas d'acidification insuffisante (lent abaissement du pH, pH final trop élevé). L'affouragement d'ensilage ou d'herbe fortement souillée par de la terre augmente la teneur en clostridies dans les fèces des vaches. Cela provoque aussi indirectement une augmentation de la charge en germes du lait. Cependant une souillure du lait par le biais du circuit sanguin est impossible.

Certaines sortes de clostridies sont présentes de manière naturelle dans la flore de la panse. Ce sont presque uniquement des spécialistes adaptés au milieu de la panse. Toutefois, quelques auteurs ont isolé l'espèce potentiellement dommageable pour le fromage *C. butyricum* et cela en rapport avec un affouragement riche en hydrates de carbone.

Propriétés des clostridies

- Bactéries en forme de bâtonnets
- Se déplacent grâce à un flagelle
- Strictement anaérobies (meurent en présence d'oxygène, si pas sporulées)
- Capable de sporuler lors de conditions défavorables (par ex. absence de milieu nutritif). Une capsule très résistante se forme à l'intérieur de la cellule contre les impacts de l'environnement (par ex. chaleur).
- Production d'énergie au travers de la fermentation anaérobie où, outre du CO₂ il se forme aussi généralement de l'hydrogène (H₂). L'hydrogène gazeux est difficilement soluble dans l'eau et cela engendre une formation d'ouverture immédiate dans le fromage.

2 Clostridies dommageables pour le fromage

2.1 Classification des clostridies dommageables pour le fromage

Parmi les 100 espèces de clostridies connues, seules quelques-unes sont importantes pour la fabrication fromagère:

Espèces protéolytiques

- *Clostridium bifermentans*
- *Clostridium botulinum de type A, et en partie B et F*
- *Clostridium oceanicum*
- *Clostridium perfringens*
- *Clostridium sporogenes*

Espèces saccharolytiques

Tabl. 1: Propriétés de clostridies potentiellement dommageables pour le fromage

Espèces	Valeur aw minimale	Température minimale	pH minimal	pH optimal	Glucose	Galactose	Lactose	Acide lactique	Germes protéolytiques
<i>C. butyricum</i>	0.97 (<5% NaCl)	≥ 7°C	≥ 4.8	um 6.5	+	+	+	+/- (>pH 5.3)	+/-
<i>C. tyrobutyricum</i>	0.96 (<6% NaCl)	>10°C	4.2-4.8	5.0-5.9	+	+/-	-	+	-
<i>C. beijerinckii</i>	0.96	≥ 7°C	≥ 4.8	Pas d'indic.	+	+	+	+/-	-
<i>C. sporogenes</i>	0.95 (≤6% NaCl)	≥10°C	5.0-5.8	6.0-7.5	+	Pas d'indic.	-	-	++
<i>C. bifermentans</i>	0.96	>7°C	4.5	Pas d'indic.	+	Pas d'indic.	-	-	+
<i>C. oceanicum</i>	0.94 (<10% NaCl)	≥3°C	5.5-6.0	6.5-8.6	+	Pas d'indic.	Pas d'indic.	Pas d'indic.	++

2.3 *Clostridium butyricum*

En général, *Clostridium butyricum* peut transformer le lactose mais pas l'acide lactique. L'acide butyrique, l'acide acétique, l'hydrogène et le bioxyde carbonique. *C. butyricum* tolère moins l'acide et le sel de cuisine que *Clostridium tyrobutyricum*. L'absence de sucre et la faible tolérance au sel expliquent pourquoi *C. butyricum* est rarement identifié comme agent nuisible et est presque uniquement mis en relation avec une formation d'ouverture précoce (cf. fig. 1). *C. Butyricum* ne joue aucun rôle dans la formation de fermentations secondaires. Certaines souches peuvent former la toxine botulique hautement toxique. Par chance, ces souches sont très rares.



Fig. 1: Ouvertures formées par *C. butyricum* dans un fromage de 3 mois. Etant donné que la fermentation défectueuse s'est arrêtée après la fermentation du sucre résiduel, un léger gonflement s'est formé au cours de la maturation dans les meules jeunes (1-2 semaines). Les teneurs en acide butyrique de tels fromages dépassent rarement 1,5 mmol/kg.

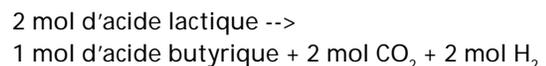
2.4 *Clostridium tyrobutyricum*

C. tyrobutyricum n'est pas un proche parent des autres clostridies potentiellement dommageables pour le fromage. L'espèce peut utiliser le glucose mais en général pas le lactose. La particularité de *C. tyrobutyricum* est de pouvoir fermenter de l'acide lactique et le transformer en acide butyrique, en CO₂ et en hydrogène. Cela engendre généralement un fort gonflement (fig. 2) du fromage. *C. tyrobutyricum* est l'espèce de clostridies la plus répandue dans les mauvais ensilages. Il est souvent identifié comme le principal agent responsable des fermentations butyriques tardives. Ceci en raison de sa capacité à transformer le lactate et à sa tolérance élevée à l'acidité.



Fig. 2: Emmentaler de 2 mois gonflé par *C. tyrobutyricum*

La forme de fermentation butyrique la plus répandue, la fermentation tardive, est provoquée par l'espèce de bactérie sporulée *Clostridium tyrobutyricum*. Du point de vue biochimique, la fermentation défectueuse peut être décrite de la manière suivante:



Dans 1 kg de fromage où 1 mmol d'acide butyrique a été produite par des clostridies, il s'est formé 45 ml d'hydrogène (quantité de gaz sous pression normale) non soluble dans l'eau et 45 ml de CO₂ (quantité de gaz sous pression normale).

2.5 *Clostridium sporogenes*

C. sporogenes est fortement protéolytique et utilise différents acides aminés pour la production d'énergie. A cette occasion, il se forme une large gamme de métabolites et de gaz (CO₂ et H₂) en partie nauséabonds. Aux endroits touchés, la pâte du fromage est plus claire (taches claires ou parties pourries de couleur blanche). Au travers de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse (GC), on remarque tout l'éventail typique des acides carboxyliques volatils, acide caproïque inclus, qui, comme une part de l'acide butyrique, provient de la dégradation de la matière grasse par *C. sporogenes*. Ce défaut du fromage qualifié de pourriture blanche est relativement rare. Il est surtout présent dans l'emmental car le pH est plus élevé dans les jeunes fromages. La faible teneur en sel et le passage en cave chaude favorisent la germination de *C. sporogenes*.



Fig. 3: Emmental avec pourriture blanche due à *C. sporogenes*. Les endroits décomposés de couleur blanche sont caractéristiques ainsi que l'odeur nauséabonde.



Fig. 4: Points gris formés des sporulées anaérobies dans une fromage à pâte mi-dure de 5 mois.

2.6 *Clostridium oceanicum*

C. oceanicum est tout comme *C. sporogenes* un germe fortement protéolytique, mais présente une meilleure tolérance au sel que ce dernier. Dans la littérature, cette espèce que l'on rencontre dans les sédiments marins, est décrite comme étant à la base des pourritures de surface dans le fromage affiné sous film. Le bain de sel est une source d'infection type. Une caractéristique de *C. oceanicum* est la présence de cellules à deux spores.

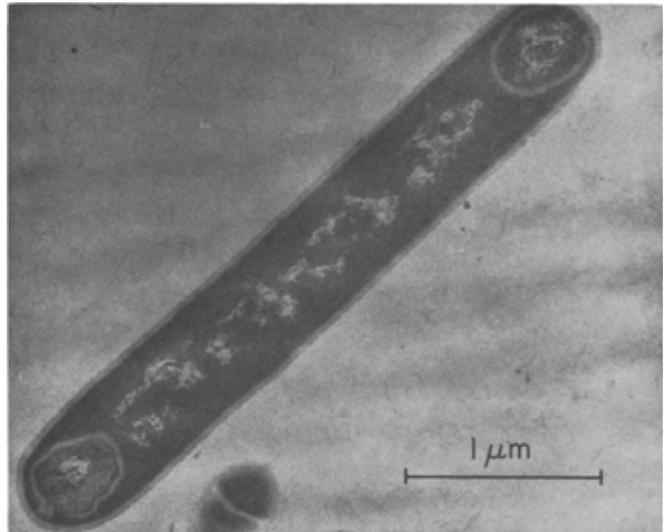


Fig. 5: *Clostridium oceanicum*. La photo montre une cellule avec deux spores aux extrémités. Selon la souche, peu ou beaucoup de cellules sporulées disposent de deux spores.

2.7 *Clostridium botulinum*

C. botulinum constitue l'un des poisons les plus connus abrégé «Botox». Un dixième d'un milliardième de gramme suffit pour tuer un être humain. *C. botulinum* est redouté pour ses intoxications alimentaires dans les conserves et les préparations de viande. On trouve également les spores dans le lait. Dans les années 70, on a enregistré plusieurs cas d'intoxication en France et en Suisse suite à la consommation de brie. En outre, en 1996, du fromage frais (mascarpone) conservé à une température trop élevée a provoqué huit intoxications dont une s'est révélée mortelle. Cependant, dans les conditions de fabrication des fromages à pâte dure et mi-dure, *C. botulinum* ne se développe pas.

2.8 Importance des différents clostridies nuisibles pour les fermentations butyriques

Dans pratiquement tous les cas de fermentations secondaires où il y a une formation de gaz importante et une teneur élevée en acide butyrique (> 3 mmol/kg après déduction de l'acide butyrique formée par la lipolyse), on peut détecter *C. tyrobutyricum* dans le fromage. Parallèlement, on a détecté d'autres clostridies comme *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* ou *C. bifermentans*. Toutefois, d'après les connaissances dont on dispose aujourd'hui, seule *C. tyrobutyricum* est en mesure de provoquer la fermentation butyrique lorsque la teneur en spores du lait est faible.

3 Détection de fermentations défectueuses provoquées par des clostridies

3.1 Identification du défaut classiques

Dans de nombreux cas, on peut identifier de manière incontestable la fermentation butyrique causée par *Clostridium tyrobutyricum* sans analyse de laboratoire si les points suivants apparaissent simultanément:

- Gonflement du fromage apparaissant généralement au plus tôt 3-6 semaines après la fabrication (lors d'une température de maturation >18°C ou de forte contamination du lait év. plus tôt)
- Importante formation d'ouvertures et formation de lainures dans le Gruyère et les fromages semblables (voir photos)
- Odeur d'acide butyrique et goût de rance marqués
- Libération d'hydrogène (gaz inflammable) lorsque l'on perce le fromage avec une sonde

Il est clair que dans la pratique on rencontre aussi souvent des fermentations butyriques moins prononcées que l'on ne peut pas identifier avec certitude. Dans ces cas, le résultat visuel et sensoriel doit être confirmé par une analyse de laboratoire. Cela est surtout valable lorsqu'il s'agit d'identifier certains lots ou jours de fabrication au sein d'une production mensuelle.



Fig. 6: Défauts classiques de différentes sortes de fromages lors de fermentations butyriques dues à *C. tyrobutyricum*. Photos du haut: fromage à pâte dure enmorgée. Photos du bas: fromages à pâte mi-dure.

3.2 Détection à l'aide du microscope

Lorsque l'on soupçonne une fermentation défectueuse due à des clostridies, la détection des clostridies à l'aide du microscope est très rapide. Avec un tampon stérile humidifié, on effectue un prélèvement sur les ouvertures et on analyse le matériel avec un grossissement d'au moins 800 fois. Si, à cette occasion, on trouve les bâtonnets avec la forme typique de massue et un gonflement net au niveau des spores placés aux extrémités, on est certain d'avoir détecté des clostridies. Bien que l'aspect des cellules sporulées varie en fonction de l'espèce, il n'est pas possible d'identifier avec certitude le type de clostridies par voie microscopique.

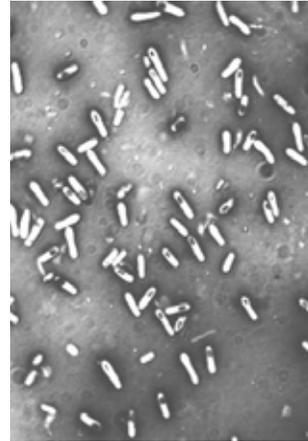


Fig. 7: Vue au microscope représentant *C. tyrobutyricum* avec des spores. Le gonflement des cellules en forme de massue au niveau des spores (= corpuscule intracellulaire de couleur foncée) est typique.

3.3 Détection à l'aide d'un milieu de culture

Les méthodes utilisées pour la détection de spores de clostridies dans le lait (voir ci-dessous) peuvent l'être également pour les analyses du lait (voir chapitre 4). Ainsi, des chercheurs italiens (Bacci et al. 2002) ont détecté, dans du fromage à pâte extra-dure avec fermentation butyrique, des teneurs en spores comprises entre 4'000 et 160'000 spores par gramme, et cela aussi bien avec la méthode NPP qu'avec la méthode de filtration. Pour l'analyse, on a homogénéisé à chaque fois 10 g de fromage râpé. Les teneurs en acide butyrique des fromages étaient comprises entre 2,7 mmol/kg et 21 mmol/kg!

ALP a sporadiquement recherché des spores dans des fromages suspects en utilisant la méthode NPP. Dans les cas positifs, on a enregistré des teneurs en spores comprises entre 46'000 et >1 million/g. Cependant, il y a également eu des cas où, malgré une teneur élevée en acide butyrique et une formation de gaz dans le fromage, on n'a pas détecté suffisamment de spores (0-5 spores/g).

Ceci peut s'expliquer par les raisons suivantes:

- Il n'y avait effectivement pas de fermentation défectueuse due à des clostridies.
- Les clostridies n'étaient pas encore sporulées et ont été décimées au moment de la pasteurisation de l'échantillon.
- Manque d'homogénéité de l'échantillon: le fromage contenait certes des clostridies mais celles-ci n'ont pas été détectées dans l'échantillon.

Les clostridies se développent dans le fromage sous forme de colonies dans des endroits spécifiques (voir ci-dessus fig 4). Elles se développent uniquement dans les zones de lainure ou des ouvertures. Il arrive que l'on ne trouve aucune ou uniquement quelques spores inactives dans les échantillons prélevés avec une sonde. La méthode décrite ci-dessous portant sur la détection de l'acide butyrique à l'aide d'une GC (voir ci-dessous) est plus fiable à notre avis car

l'acide butyrique se propage dans la pâte du fromage en tant que petite molécule soluble dans l'eau, contrairement aux bactéries qui ne peuvent se propager dans la pâte.

Pour cette raison, ALP recommande la méthode GC pour la clarification des cas suspects d'acide butyrique et non pas les analyses microbiologiques. Ces dernières peuvent être cependant indiquées s'il s'agit d'isoler l'agent nuisible et de le déterminer de manière plus précise. En ce qui concerne les analyses microbiologiques, il est particulièrement important d'homogénéiser une quantité d'échantillon aussi grande que possible, zones suspectes incluses (par ex. lainures) et d'effectuer ensuite les analyses.

3.4 Détection d'acides carboxyliques volatils par chromatographie en phase gazeuse (GC)

Avec cette méthode, les acides carboxyliques volatils sont captés à l'aide de vapeur d'eau dans un échantillon de 10 g. Ensuite, dans le distillat récolté on retrouve tous les acides carboxyliques volatils de l'acide formique (C1) jusqu'à l'acide caproïque (C6). Le distillat est analysé par chromatographie gazeuse afin de déterminer les concentrations des différents acides.

Les acides carboxyliques volatils détectés permettent dans de nombreux cas de déterminer de manière sûre le type de fermentation défectueuse, par ex. dans le cas d'une fermentation butyrique classique. Comme le montre le tableau 2, la chromatographie en phase gazeuse fournit, pour les clostridies protéolytiques comme par ex. *C. sporogenes*, uniquement une indication. Les acides isocaproïques présents dans ce cas peuvent aussi avoir été formés par des protéolytes du groupe des «halotolérants».

Influence de l'échantillonnage

Bien que la méthode soit moins sensible aux résultats faussement négatifs, l'échantillonnage peut influencer le résultat. Le tableau 3 montre une analyse d'un Gruyère. La zone avec des lainures présentait une teneur en acide butyrique de 4,7 mmol/kg. Cette teneur est due aux bactéries butyriques car la part d'acide butyrique provenant de la lipolyse était faible. En dehors de la zone des lainures, les valeurs d'acide butyrique étaient nettement moins élevées mais toujours bien au-dessus de la limite de 1,5 mmol/kg.

Conclusion: la méthode GC permet une identification sûre des fermentations butyriques dans le fromage. Cependant, avec cette méthode il y a aussi des cas limites comme avec toutes les autres méthodes. Ce qu'il faut en tout cas recommander, c'est l'utilisation d'une quantité de matériel suffisante ou un échantillon qui englobe l'endroit défectueux du fromage (souvent pas possible avec l'emmental).

Espèces	Acide acétique	Acide propionique	Acide n-butyrique	Acide isobutyrique	Acide isovalérique	Acide i-caproïque
<i>C. bifermentans</i>	x	x	x	x	x	x
<i>C. sporogenes</i>	x	x	x	x	x	x
<i>C. butyricum</i>	x		x			
<i>C. tyrobutyricum</i>	x		x			
<i>C. beijerinckii</i>	x		x			

Tabl. 2 Produits de fermentation issus d'espèces de clostridies dommageables pour le fromage

		Zone sans ouverture Echantillon 1 (centre)	Zone sans ouverture Echantillon 2	Zone avec ouverture (lainures)	Valeur de référence
Acides carboxyliques volatils (total)	[mmol/kg]	10.8	11.3	14.9	<20
Acide n-butyrique	[mmol/kg]	2.5	2.2	4.7	<1.5
Acide n-caproïque	[mmol/kg]	0.1	0.1	0.1	<0.3

Tabl. 3 Détermination des acides carboxyliques volatils à l'aide d'une GC dans un Gruyère de 6 mois avec formation locale de lainures. La zone de lainures ainsi que les deux zones sans lainure de la même meule ont été analysés.

3.5 Interprétation de l'analyse GC par rapport à la fermentation butyrique

L'acide n-butyrique libéré dans le fromage provient de trois sources potentielles:

- acide n-butyrique_{lipolyse} : provenant de la lipolyse et formé par les lipases
- acide n-butyrique_{protéolyse} : provenant de la dégradation des acides aminés par les germes de la flore du lait cru
- acide butyrique_{fermentaire} : provenant de la fermentation butyrique par des clostridies

On peut bien évaluer la quantité d'acide butyrique libérée par la lipolyse. Lors de la lipolyse, 1 mol d'acide n-caproïque est libérée pour 3 mol d'acide n-butyrique. Etant donné que, mise à part la lipolyse, il n'y a pas de source d'acide caproïque dans le fromage, l'acide n-butyrique_{lipolyse} correspond à trois fois la teneur en acide n-caproïque.

En moyenne statistique, la part d'acide butyrique de la protéolyse correspond à peu près à la teneur en acide iso-butyrique. Toutefois, cette règle n'est pas applicable dans chaque cas. L'analyse de 5'500 échantillons de fromage, examinés ces dernières années dans le cadre de fermentations défectueuses, a révélé ce qui suit:

- 75 % des 5'500 échantillons analysés contenait moins de 0,2 mmol/kg d'acide i-butyrique, donc des quantités négligeables;
- 4 % des échantillons contenait au moins 1 mmol/kg d'acide i-butyrique (valeurs maximales de l'ordre de 8 mmol/kg). Près de 30 % de ces échantillons contenaient plus d'acide i-butyrique que d'acide n-butyrique!
- La teneur en acide i-butyrique est en corrélation avec les acides i-valérique et i-caproïque (r = 0,8). Dans un fromage avec suspicion de fermentation butyrique, cela pourrait indiquer une activité sous la croûte simultanée de clostridies protéolytiques.
- La morge et la pâte proche de la croûte du fromage contiennent beaucoup plus d'acide i-butyrique que la partie centrale du fromage.

Sur la base de ces constatations, nous estimons qu'il n'est pas nécessaire de prendre en considération l'acide i-butyrique lors de l'évaluation par calcul de l'acide n-butyrique fermentaire et nous utilisons la formule suivante:

$$\text{Acide n-butyrique}_{\text{fermentaire}} = \text{acide n-butyrique}_{\text{total}} - 3 (\text{acide n-caproïque})$$

Dans les expertises, ALP va désormais indiquer, outre l'acide butyrique_{total}, l'acide n-butyrique_{fermentaire} selon l'équation précitée et baser l'interprétation sur la dernière valeur citée. Par rapport à l'acide butyrique_{total} l'acide n-butyrique_{fermentaire} présente l'avantage de prendre en considération l'augmentation de la teneur en acide butyrique due à la maturation, attribuée presque uniquement à la lipolyse dans le fromage sans défaut.

Important: même avec une chromatographie en phase gazeuse, une fermentation butyrique s'avère confirmée uniquement si le fromage présente, outre une valeur butyrique trop élevée, un défaut typique. Par exemple, un résultat doit être considéré comme incertain si on a mesuré 4,0 mmol/kg d'acide n-butyrique_{fermentaire} mais que le fromage ne présente pas de défauts au niveau de l'ouverture (par ex. lainure).

Marche à suivre lors de cas ambigus

Dans la pratique, on rencontrera toujours des cas douteux. En voici quelques exemples:

1. Le fromage présente de grandes ouvertures ou trop d'ouvertures, mais les valeurs relatives à l'acide butyrique sont encore juste comprises dans la norme.

	Echantillonnage	Souçon	Fermentation butyrique confirmée
		Acide n-butyrique _{fermentaire}	
Emmental	Plusieurs sondages par meule	≥1,0 mmol/kg	≥2,0 mmol/kg
Sbrinz	Lainure	≥1,0 mmol/kg	≥2,0 mmol/kg
Gruyère	Lainure	≥1,5 mmol/kg	≥3,0 mmol/kg
Fromage non pasteurisé à pâte mi-dure	Morceau de fromage (>100 g) ou sondage à l'endroit du gonflement	≥1,5 mmol/kg	≥3,0 mmol/kg
Fromage issu de lait pasteurisé	Morceau de fromage (>100 g) ou sondage à l'endroit du gonflement	≥1,0 mmol/kg	≥2,0 mmol/kg

Tabl. 4 Valeurs limites pour l'acide butyrique

Raisons possibles:

- On est en présence d'une autre fermentation défec- tueuse (fermentation propionique, fermentation lac- tique due à des lactobacilles hétérofermentaires facul- tatifs, formation d'amines biogènes et/ou GABA par le biais d'une dégradation des acides aminés).
- Erreur au niveau de l'échantillonnage (la source d'infec- tion n'a pas été prélevée avec l'échantillon).
- Erreur d'analyse.

Suite des opérations:

- Si l'on peut exclure d'autres fermentations défec- tueuses, on peut laisser mûrir les fromages et les analy- ser encore une fois plus tard.
2. Le fromage présente des valeurs butyriques trop élevées et les ouvertures types font défaut.

Raisons possibles:

- Il n'y a pas de fermentation butyrique causée par *C. tyrobutyricum*. L'acide butyrique provient d'une forte protéolyse (indice: valeurs élevées pour les acides iso-carboxyliques).
- L'acide butyrique provient de la dégradation de la matière grasse (lipolyse).

Suite des opérations:

- Contrôler la valeur de l'acide caproïque
- Détection de spores dans le fromage (NPP ou méthode de filtration; l'échantillon doit présenter des endroits défectueux!).

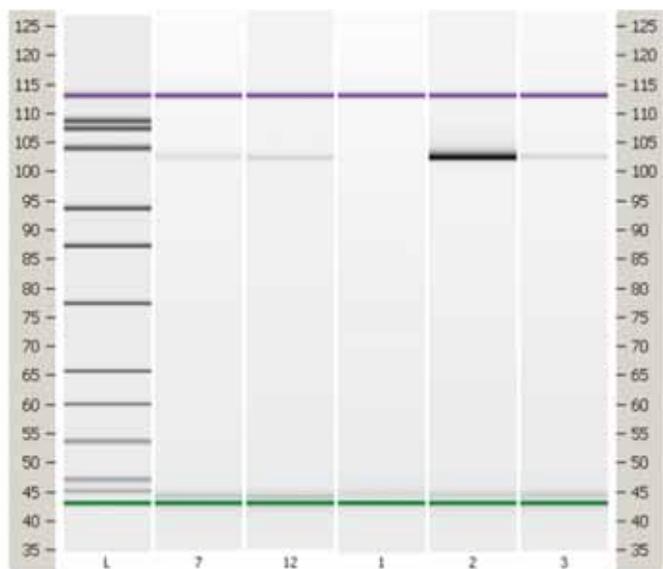


Fig. 8: Détection de *C. tyrobutyricum* dans des échantillons de fromage à l'aide d'une PCR (16S RNA) afin de clarifier des fermentations butyriques. Echantillons de gauche à droite: L = marqueur du poids moléculaire (bp), 7 = Gruyère échantillon 1, 12 = Gruyère échantillon 6, 1 = Bündner Bergkäse (échantillon de référence), 2 = Bündner Bergkäse 2, 3 Gruyère (échantillon de référence issu du commerce de détail).

3.6 Détection de l'agent responsable à l'aide d'une méthode de biologie moléculaire

Depuis quelques années, on dispose de méthodes de bio- logie moléculaire qui permettent de détecter des clostri- dies dans le fromage à l'aide du matériel génétique (ADN). ALP a utilisé l'une de ces méthodes (Le Bourhis A.-G. et al.; 2005) lors de quelques sinistres où le résultats de la chro- matographie gazeuse était en contradiction avec l'aspect du dommage (cf. tableau 5 et fig. 8).

Cette méthode comporte les étapes suivantes:

1. **Extraction** de l'ADN des bactéries de la masse du fromage.
2. Amplification de la séquence caractéristique des clostri- dies au sein de l'ADN à l'aide de la réaction en chaîne (PCR). A cet effet, on ajoute lesdits «primers» à l'échan- tillon, qui reconnaissent spécifiquement l'ADN des clostri- dies et définissent la séquence de l'ADN à amplifier. Il existe des «primers» qui sont spécifiques pour une seule espèce comme par ex. *C. butyricum* et d'autres qui englobent tout un groupe, par ex. le groupe I (*C. tyro- butyricum*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. pasteurianum*).
3. Electrophorèse: séparation à l'aide de courant continu et mise en évidence des séquences d'ADN amplifiées dans un gel.
4. Ev. tests supplémentaires comme par ex. séquençage des fragments d'ADN amplifiées afin d'identifier l'espèce de manière incontestable.

La figure 8 montre le résultat d'une analyse PCR de diffé- rents échantillons de fromage. La bande foncée à la posi- tion 103 bp amorce n° 2 (Bündner Bergkäse) marque le produit PCR type pour les clostridies et confirme la pré- sence de *C. tyrobutyricum*. Chez les autres produits, cette bande est absente ou très faible. Les échantillons qui ne donnent qu'un signal faible n'ont pas pu être classés comme appartenant à une espèce de clostridies typique- ment dommageable pour le fromage. On a uniquement pu confirmer qu'il s'agissait de clostridies.

Les résultats de la PCR sont en partie étonnants si on les compare aux résultats de l'analyse GC des fromages (tabl. 5). Ils coïncident relativement bien avec le défaut (tabl. 5 et fig. 9) et les résultats de la détection de spores dans les fromages à l'aide de milieux de cultures.



Photo 9: vue en coupe du fromage „Gruyère 6“ du tableau 5 avec une teneur en acide butyrique de 7,49 mmol/kg, mais avec un résultat négatif lors de la détection microbienne et une méthode de biologie moléculaire de clostridies.

Dénomination	Défaut	Age	Acide propionique	Acide n-butyrique	Acide i-butyrique	Acide n-caproïque	Acide n-butyrique de la fermentation	Détection de spores à l'aide de cultures*
Gruyère 1	doux, petites ouvertures	7 m	8.39	11.32	0.73	0.35	10.27	Négatif
Gruyère 6	doux, peu d'ouvertures	7 m	6.99	7.49	0.32	0.06	7.31	Négatif
Bündner Bergkäse (échantillon de référence)	en ordre	3 m	0.94	0.25	0.79	0.02	0.19	Négatif
Bündner Bergkäse 2	lainure, fermentation secondaire	4 m	2.26	1.54	1.92	0.00	1.54	Positif

* Enrichissement dans un bouillon Bryant-Burkey

Tabl. 5: Caractéristiques des échantillons de fromage analysés à l'aide de la PCR (cf. fig. 8)

L'exemple illustré montre qu'il est important d'interpréter les résultats de l'analyse GC en prenant toujours en considération le défaut. La détection avec une méthode de biologie moléculaire est par contre très spécifique mais possède aussi, tout comme la détection de spores dans le fromage à l'aide de cultures, ses points faibles:

- Il faut homogénéiser une quantité suffisamment grande d'échantillon afin de pouvoir détecter au moins une colonie de clostridies à l'aide de l'échantillon.
- Même des clostridies qui n'ont pas germé sont détectés et donnent de faibles signaux.
- On ne connaît pas encore assez la sensibilité et la robustesse de la méthode.
- Actuellement, encore relativement chère.
- ALP ne propose pas encore cette méthode pour les analyses de routine étant donné que la fiabilité de la méthode n'a pas encore été suffisamment clarifiée.

Cependant, les analyses de la méthode biologie moléculaire continuent de se développer, se simplifient et deviennent moins coûteuses. Il serait donc hasardeux de pronostiquer que la détection PCR de clostridies dommageables pour le fromage va faire son entrée au niveau pratique.

C'est surtout ladite Real-Time-PCR (en temps réel) (fig. 10) qui est intéressante. Elle est facile à exécuter et fournit en outre des résultats quantitatifs, le signal indique que le nombre de molécules d'ADN extraites de l'échantillon était élevé (fig. 10). De plus, on peut en principe développer des systèmes permettant de détecter en même temps plusieurs espèces.

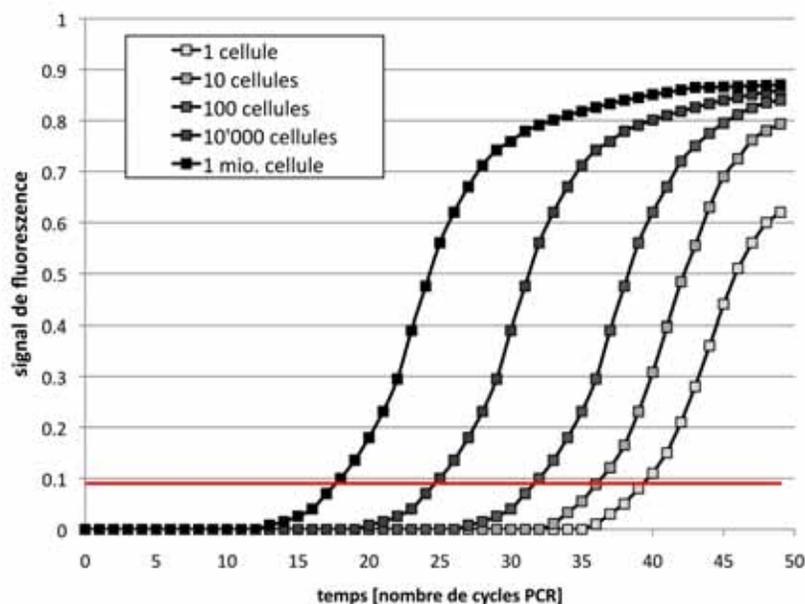


Fig. 10: La PCR en temps réel fournit des résultats quantitatifs

4 Détermination de la teneur en spores du lait

4.1 Méthodes pratiques

Certaines fromageries surveillent elles-mêmes la teneur en spores anaérobies du lait. Un des tests utilisés à cet effet est le test MRCM de l'entreprise Foodtech AG (fig.11). Les éprouvettes livrées prêtes à l'emploi contiennent un milieu de culture stérile (RCM modifié) et de la paraffine. Le déroulement de l'analyse est le suivant:

- A l'aide d'une seringue stérile, on injecte 10 ml de lait dans l'éprouvette à travers la membrane en caoutchouc.
- L'échantillon est pasteurisé pendant 15 min. avec un bain-marie à 75° C, alors que la paraffine fond et forme une couche sur le milieu de culture.
- Après refroidissement, l'éprouvette est incubée pendant 4 jours à 37° C.
- La formation de gaz et d'un virage du rouge au jaune indiquent une réaction positive.
- Le test fournit uniquement un résultat qualitatif (positif / négatif).
- Seuil de détection: 100 spores par litre.
- Sélectivité

Outre le test MRCM, le concept de gestion de la qualité de FROMARTE „Analyse pour la détection de spores anaérobies“ fait aussi partie des méthodes utilisées dans la pratique. Lors de cette analyse, on acidifie 30 ml de lait avec 7 gouttes d'acide lactique à 9 %. Le mélange est recouvert de paraffine, pasteurisé à 75° C pendant 15 min. et incubé durant 4 jours.

Lors de l'utilisation de cette méthode dans la fromagerie, il faut faire attention à ce que les spores des éprouvettes positives ne parviennent pas dans l'environnement direct et ne passent pas, par le biais des mains et des vêtements, dans les locaux de fabrication. Les éprouvettes utilisées devraient être stérilisées à 121° C avant d'être jetées!



Photo 11: test MRCM pour la détection de spores dans la pratique.

4.2 Méthodes de laboratoire

En Suisse, on utilise surtout deux méthodes pour la détection de spores anaérobies dommageables pour le fromage, à savoir la méthode NPP moins sélective et la méthode de filtration qui permet une détection relativement sélective de *C. tyrobutyricum*.

4.2.1 Méthode NPP ou MPN

NPP signifie Nombre le Plus Probable, c'est une méthode très répandue en microbiologie pour l'évaluation statistique du nombre de germes. A cet effet, on répartit une quantité déterminée de lait à analyser sur un nombre défini d'éprouvettes dans un milieu de culture (cf. fig. 12).

A l'aide du nombre de éprouvettes dans lesquelles on a relevé une croissance, on peut lire le nombre de spores le plus probable (NPP) dans un tableau.

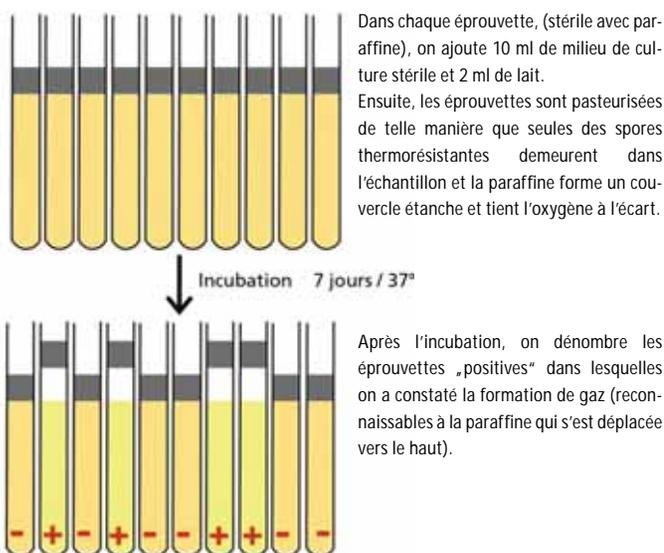


Fig. 12: Principe du NPP pour l'estimation du nombre de spores dans le lait

En Suisse (surtout en Suisse romande), on utilisait jusqu'à maintenant trois différentes méthodes NPP:

- Méthode ALP (pas accréditée)
Milieu de culture: agar pomme de terre-dextrose
Format: 4x6 ml + 4x3 ml + 4x1ml de lait
- Méthode LAAF (pas accréditée)
Milieu de culture: Reinforced Clostrium Agar (RCA ou RCM)
Format: 4x6 ml + 4x3 ml + 4x1ml de lait
- Méthode CNERNA (F) (accréditée)
Milieu de culture: Bryant-Burkey-Medium
Format: 10x1 ml ou 5x1 ml et 5x0,1ml

Sur l'initiative de l'Interprofession du Gruyère, les laboratoires de Suisse romande ont convenu l'année dernière d'uniformiser la méthode NPP. La méthode devrait en outre pouvoir être accréditée et adaptée aux besoins de la fabrication du Gruyère.

Après de nombreux essais, on a désormais introduit une forme légèrement modifiée de la méthode (CNERNA) très répandue en France. La méthode est reconnue et la qualité est garantie au travers d'essais interlaboratoires réguliers de l'institut français Cevalait. Le milieu est disponible dans le commerce tout comme des éprouvettes stériles à usage unique avec de la paraffine, ce qui simplifie grandement le travail en laboratoire.

4.2.2 Méthode NPP en Romandie (méthode CNERNA modifiée)

Milieu de culture
Bryant-Burkey-Medium (Merck, Biokar, BioLife)

Format
10x2 ml pour le lait sans ensilage
5x1 + 5x0,1 ml pour le lait de silo

Incubation
7 jours / 37°C

Limite de détection
lait sans ensilage: 53 spores/l
lait de silo: 180 spores/l

Limite de détection supérieure
lait sans ensilage: 1'200 spores/l
lait de silo: 16'000 spores

La méthode accréditée est proposée par les laboratoires ARQHA (Moudon) et LAAF (IAG, Grangeneuve).

La comparaison de méthodes a montré que la «nouvelle» méthode fournit des valeurs environ deux fois plus élevées que les méthodes NPP classiques ALP et LAAF. C'est la raison pour laquelle les valeurs limites ont été adaptées et revues à la hausse.

	Limite actuelle [spores/l]	Nouvelle limite [spores/l]
Méthode	ALP / LAAF	CNERNA modifiée
Lait de chaudière	< 140	< 260
Lait de producteur (sans ensilage)	< 210	< 350
Lait de producteur (lait de silo)	< 1'500	< 2'800

Tabl. 6: Valeurs limites pour la teneur en spores du lait (méthode NPP)

4.2.3 Echantillons de contrôle et marche à suivre en cas de dommage

Le prélèvement et la congélation d'échantillons de contrôle sont devenus obligatoires dans les fromageries. De nombreuses fromageries dont la livraison de lait a lieu deux fois par jour prélèvent des échantillons de 10 ml de chaque livraison et les congèlent immédiatement (photo 13).

En même temps que l'uniformisation des analyses, l'Interprofession du Gruyère a adopté une marche à suivre uniforme lors de l'analyse des échantillons de contrôle en cas de dommage (cf. tabl. 7).

Ce procédé semble être compliqué, mais il permet de diminuer l'incertitude de mesure des spores. L'analyse d'échantillons multiples permet d'obtenir une mesure plus précise et l'évaluation des producteurs de lait est ainsi meilleure.



Photo 13: Prélèvement d'échantillons de contrôle de lait de producteur

Nombre de jours avec fermentation butyrique	Echantillon de mélange du producteur	Nombre d'analyses parallèles pour l'échantillon de mélange	Limite (méthode CNERNA modifiée)
1 jour	Lait du matin et du soir	1	< 350 spores/l
2 jours	Toutes les traites de la période	2	Moyenne des 2 déterminations < 350 spores/l
3 jours ou plus	Toutes les traites de la période	3	Moyenne des 3 déterminations < 350 spores/l

Tabl. 7: Marche à suivre lors de l'analyse d'échantillons de lait de contrôle en cas de dommage

4.2.4 Méthode de filtration selon Bourgeois & Casey

Sur la base de la méthode développée par Bourgeois en France, ALP a développé dans les années 90 une méthode pour la détection sélective de *C. tyrobutyricum*. La méthode est connue de manière générale en tant que méthode de filtration parfois aussi sous le nom de «méthode rapide».

Principe de la méthode: pasteuriser 40 ml de lait afin de sélectionner les spores (75° C / 15 min.). Après un traitement enzymatique, on peut filtrer le lait avec un filtre à membrane avec une taille de pores de 0,8 µm. Le filtre est ensuite posé sur un milieu nutritif sélectif à base d'agar et incubé pendant 3 jours à 37° C dépourvu d'oxygène. Après cela, les colonies sont dénombrées. La matière colorante (fuchsine acide) permet une certaine différenciation des colonies. En outre, on peut bien les étudier au microscope.

La méthode convient également pour l'analyse d'échantillons d'eau (filtration de 100 ml). Des chercheurs italiens ont testé avec succès la méthode pour l'analyse de fromages présentant une fermentation défectueuse (dilution des échantillons de fromage 1:100 – 1:1000). Par contre, l'analyse du lait de brebis cause des problèmes en raisons

de la teneur élevée en matière grasse et de la viscosité élevée.

La méthode de filtration livre des valeurs environ cinq à dix fois plus faibles que les méthodes MPN mentionnées ci-dessus. La principale raison est l'ajout d'antibiotiques au milieu nutritif (RCA avec cyclosérine), ce qui engendre l'inhibition de certaines clostridies. La durée d'incubation plus courte et le genre de culture (culture de surface au lieu de culture liquide) constituent d'autres raisons.

Dans le domaine de la surveillance de routine du lait de chaudière et de producteur, la méthode de filtration s'est imposée et a fait ses preuves en Suisse alémanique. Actuellement, les laboratoires suivants la proposent: Bamos AG (Weinfelden TG), Labeco GmbH (Alberswil LU), LAAF (IAG Grangeneuve, sur demande). Les laboratoires du transformateur de lait Emmi sont en train d'adopter cette méthode. Un groupe de travail composé de représentants des divers laboratoires sont entrain d'élaborer les bases pour l'accréditation de la méthode de filtration.

Germe	Forme de la colonie	Forme des spores
<i>C. tyrobutyricum</i>	Convexe, ronde et régulière; colonie clairement délimitée, brillante et de couleur jaunâtre à rose foncé.	Spores minces subterminales, légèrement bombées (sporulent mal).
<i>C. sporogenes</i>	Délimitation irrégulière, couleur rose tendre, tendance à «s'éparpiller».	Subterminale, cellule légèrement bombée.
<i>C. butyricum</i>	Bord de la colonie irrégulier et légèrement dentelé.	Centrale à subterminale; Pas de bombement de la cellule.
<i>C. bifementans</i>	Colonies plates sans teint avec bord diffus et précipité de 2 - 3 mm.	Centrale ou subterminale, pas de bombement de la cellule.

Tabl 8: Différenciation des clostridies sur l'agar RCM modifié avec de la cyclosérine (2 g/l) et de la fuchsine acide (1 g/l) selon Bourgeois.



	Limite [spores/l]
Lait de chaudière	< 25
Lait de producteur (sans ensilage)	< 25
Lait de producteur (lait de silo)	< 1'000
Eau	< 10

Tabl. 9: Valeurs limites pour la teneur en spores du lait lors de l'analyse avec la méthode de filtration selon Bourgeois & Casey

Fig. 14: Détermination quantitative de spores de Clostridium avec la méthode de filtration selon Bourgeois & Casey

4.2.5 Comparaison des méthodes par rapport à la validité et l'incertitude de mesure

Lors d'essais, on a augmenté par étape la charge en spores du lait de chaudière sans ensilage (teneur en spores NPP: env. 45/l, filtration: env. 15 UFC/l) par l'incorporation de lait de silo et le lait a été transformé en emmental et chaque essai a été répété trois fois. Avec l'incorporation de 2 % de lait de silo, un des trois fromages d'essai présentait une fermentation butyrique et avec 5 % c'était déjà deux sur trois. L'essai avait également pour objectif de comparer la fiabilité de la méthode de filtration et de la méthode NPP.

Comme le montre la fig. 15, la méthode par filtration présente une différence plus marquée entre les fabrications avec fermentation butyrique et les fromages sans défaut (évaluation réalisée à l'aide d'acide carboxylique volatil dans le fromage mûr). Il faut toutefois mentionner que la flore des spores de cet essai disposait d'une composition semblable en raison de l'ajout de lait de silo. Il est vraisemblable que la corrélation entre les deux méthodes lors de l'analyse d'échantillons de lait avec une composition de la flore des spores différente serait moins bonne.

La fig. 15 montre aussi que, lors de l'essai, aucun lait avec une teneur en spores de moins de 40/l n'a engendré une fermentation butyrique dans le lait. Ainsi, la valeur limite de <25/l est conforme.

Les expériences pratiques montrent qu'avec la méthode NPP on observe davantage de cas lors desquels les fromages ne développent pas de fermentation défectueuse malgré un nombre de spores élevé. Inversement, on trouve toujours plus de cas où l'analyse du lait de chaudière avec la méthode de filtration a donné un résultat négatif (<25 spores/l) bien que les fromages aient subi une fermentation butyrique.

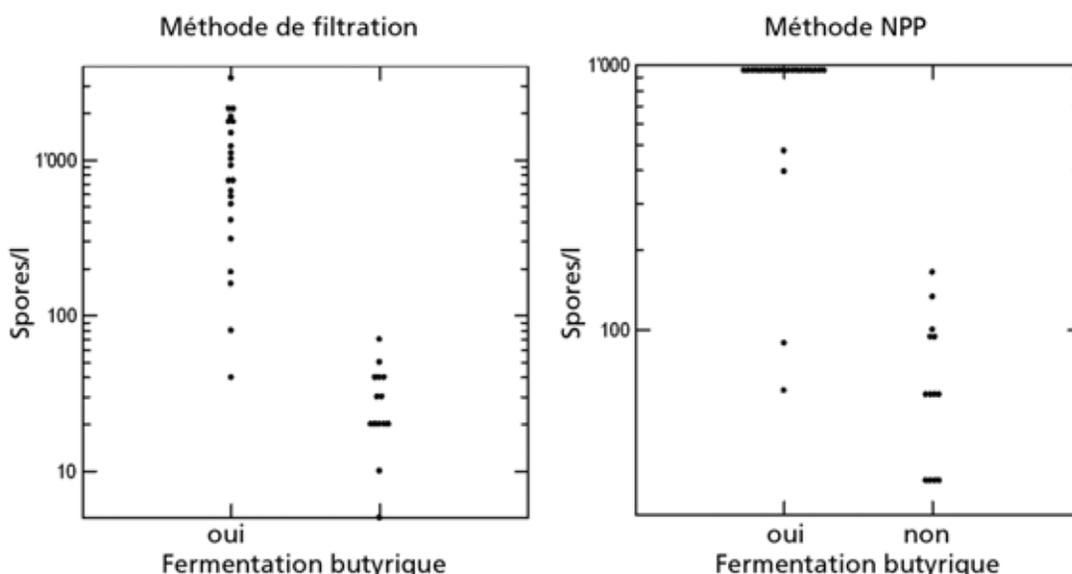


Fig. 15: Relation entre la teneur en spores du lait de chaudière et l'apparition de fermentations butyriques lors de fabrications d'essai (emmental modèle, essai d'ALP). Graphique de gauche: teneur en spores avec la méthode de filtration selon Bourgeois (modification Casey); graphique de droite: teneur en spores avec la méthode NPP (agar dextrose de pommes de terre).

Les graphiques des fig. 16 et 17 montrent que les valeurs de la méthode de filtration (40 ml) et de la méthode NPP (10 x 2 ml) varient fortement dans le domaine des valeurs limites valables. Ceci est surtout dû au fait que l'on effectue les mesures près de la limite de détection et devons nous contenter d'une quantité d'échantillon de 20-40 ml de lait. Il en résulte, pour les deux méthodes, une gradation relativement grossière pour les résultats possibles.

On peut réduire le problème de l'incertitude de mesure de la quantification des spores anaérobies en augmentant le nombre de mesures.

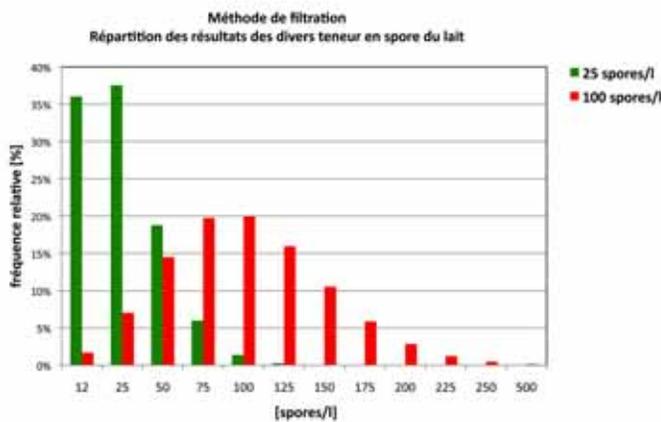


Fig. 16: Répartition des résultats de deux laits contenant 25 et 100 spores/l analysés à plusieurs reprises avec la méthode de filtration (modèle de calcul sans prise en considération d'erreurs de laboratoire et du manque d'homogénéité de l'échantillon).

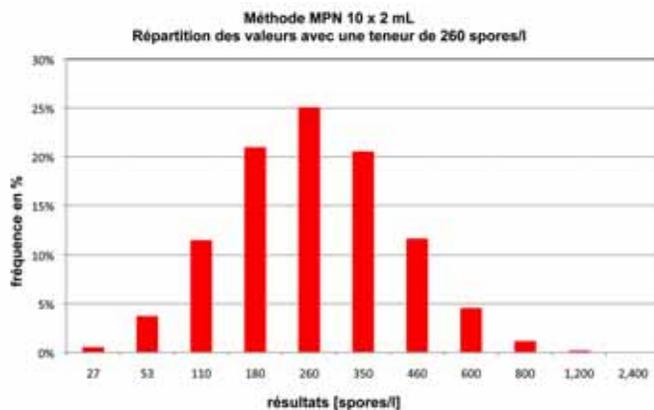


Fig. 17: Répartition des résultats d'un lait contenant 260 spores/l analysé à plusieurs reprises avec la méthode NPP (modèle de calcul sans prise en considération d'erreurs de laboratoire et du manque d'homogénéité de l'échantillon).

4.3 Analyse des spores de lait bactofugé

En général, la bactofugeuse permet de retirer de manière fiable les spores du lait (fig. 18). Sur la base des données présentées, on peut estimer la teneur moyenne en clostridies du lait bactofugé à 1-2 spores par litre. Cependant, dans la pratique, on rencontre sporadiquement des fermentations butyriques dans le fromage fabriqué à partir de lait de silo. Cela peut s'expliquer par une charge en spores trop élevée du lait de départ ou un degré d'efficacité moins bon dû à des problèmes de fonctionnement (par ex. entrée d'air) ou une mauvaise manipulation (par ex. contre-pression insuffisante).

Lors de ses activités de conseil, ALP a été confrontée à un cas où de nombreuses productions journalières d'un fromage à pâte mi-dure pasteurisé issu de lait de silo bactofugé ont été perdues en raison d'une fermentation butyrique intense. Ceci, bien que les échantillons de lait de chaudière présentaient la plupart du temps des valeurs pour les spores < 25/l. Lors de tels cas, outre les problèmes temporaires de bactofugation, il faut naturellement aussi examiner les sources de réinfection. Des analyses comparatives d'échantillons de lait avec la méthode NPP et la méthode de filtration indiquent également que le pourcentage de *C. tyrobutyricum* dans la flore des spores anaérobies est plus élevé dans le lait de silo que dans le lait sans ensilage.

Sur la base des raisons qui viennent d'être évoquées, nous recommandons, lors de l'analyse de lait bactofugé, d'analyser une quantité de lait plus grande et de réaliser le test habituel au moins deux fois.

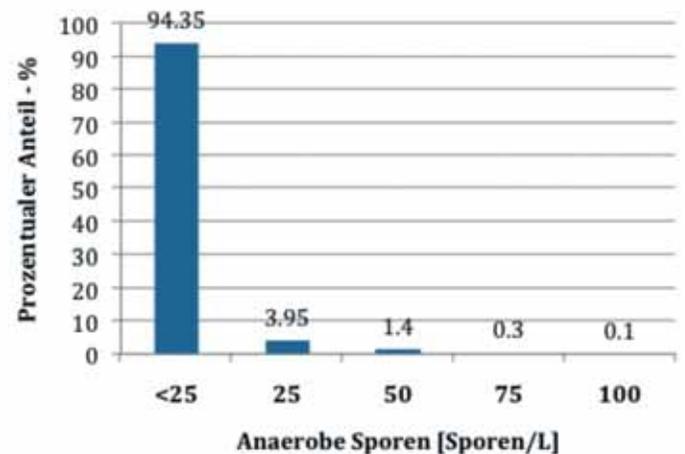


Fig. 18: Répartition du nombre de spores de Clostridium dans le lait de silo bactofugé avec une bactofugeuse fonctionnant de manière correcte (N= 1376 échantillons).

5 Résumé

Selon les compagnies d'assurance, les dégâts causés par les clostridies dans les fromageries ont nettement augmenté en ce qui concerne la somme des dommages. Les principaux responsables sont *Clostridium tyrobutyricum* et plus rarement *C. butyricum* et *C. sporogenes*. Les fermentations défectueuses dues à *C. butyricum* se produisent dans le fromage frais aussi longtemps qu'il reste du sucre résiduelle et stoppent par la suite. C'est la raison pour laquelle les effets sont moins importants par rapport à la fermentation tardive (*C. tyrobutyricum*).

La détection de la fermentation butyrique à l'aide de la GC a fait ses preuves car l'acide butyrique se répand dans le fromage contrairement aux germes et peut pour cette raison être détectée de manière relativement sûre. Dès maintenant, ALP va également indiquer la teneur en «acide butyrique issu de la fermentation». Le calcul s'effectue selon la formule suivante. Il déduit l'acide butyrique libre issue de la lipolyse:

$$\text{Acide butyrique issu de la fermentation [mmol/kg]} = \text{acide butyrique}_{\text{total}} - 3 \times \text{acide caproïque [mmol/kg]}$$

La détection de la fermentation butyrique par le biais de la détection microbiologique ou avec une méthode de biologie moléculaire de l'agent nuisible est possible mais nécessite un échantillonnage ciblé englobant un ou plusieurs foyers d'infection dans la pâte et suffisamment de matériel bien homogénéisé.

Pour la détection des spores dans le lait, on utilise principalement la méthode NPP (méthode CNERNA) en Romandie et la méthode selon Bourgeois et Casey en Suisse alémanique. Les exigences suivantes sont valables en la matière:

	Méthode NPP (CNERNA)	Méthode de filtration
Lait de chaudière	< 260 spores / l	< 25 spores / l
Lait de producteur (sans ensilage)	< 350 spores / l	< 25 spores / l
Lait de producteur (lait de silo)	< 2'800 spores / l	< 1'000 spores / l

Etant donné que l'incertitude de mesure pour le domaine des valeurs limites est élevée aussi bien pour la méthode NPP que pour la méthode de filtration, il est recommandé de prendre des décisions sur la base de deux voire trois analyses. C'est pourquoi l'Interprofession du Gruyère a décidé qu'en cas de dommage les échantillons de contrôle de chaque producteur prélevés au cours de la période concernée (si supérieure à 3 jours) soient mélangés et qu'ensuite 3 analyses soient réalisées pour chaque producteur. Les livraisons de lait seront contestées si la moyenne des 3 analyses se situe à 350 spores par litre ou davantage.

