Dénombrement des spores de *Clostridium* «butyriques» dans le lait et dans ses contaminants : influence de la présence de lait dans le milieu de culture

G. Corrot

Institut technique de l'élevage bovin, groupement interprofessionnel d'analyses laitières de la Haute-Marne, 26, avenue du 109^e RI, 52011 Chaumont, France

(reçu le 17 juin 1987, accepté le 5 juin 1989)

Résumé — Pour déterminer si la modification du milieu de culture peut expliquer les discordances observées entre les dénombrements de spores de *Clostridium* réalisés sur du lait et ceux réalisés sur ses contaminants, nous avons comparé 2 méthodes d'analyse utilisant de l'eau stérile (méthode témoin) ou du lait stérile comme diluant. Nous avons réalisé des dénombrements sur bouses, sur boues de bactofugation et sur des laitsensemencés avec des quantités connues de ces 2 contaminants. Les résultats confirment que la présence de lait dans le milieu entraîne une surestimation des résultats du dénombrement, vraisemblablement par perte de sélectivité du milieu de Bryant et Burkey, en particulier pour les échantillons contenant de la bouse. En revanche, l'utilisation du lait stérile comme diluant permet d'obtenir une meilleure cohérence entre les résultats obtenus sur les contaminants et sur les laitsensemencés avec ceux-ci. Cette méthode peut être recommandée lorsque l'objectif poursuivi est d'analyser la chaîne de contamination en réalisant des dénombrements de spores de «butyriques» sur ensilage, bouse et lait.

spores butyriques — dénombrement — biais — lait — bouse — milieu de culture

Summary — Butyric acid bacteria spore count in milk and its contaminants : influence of the presence of milk in the culture medium. In order to determine whether the modification of the culture medium explains the differences observed between the counts of *Clostridium* spores on milk and those evaluated on its contaminants, we compared two methods of analysis using sterile water (control method) or sterile milk as diluent. We carried out counts on cow dung, bactofuge sludge, and on milk inoculated with known quantities of these two contaminants. The results confirm that the presence of milk in the culture medium occasions an overestimation of the counting values, probably owing to the loss of selectivity of the Bryant and Burkey medium, especially in samples containing dung. On the other hand, the use of sterile milk as diluent makes it possible to obtain a better coherence between the results achieved in the contaminants and in the milk inoculated with these. This method can thus be recommended when the aim pursued consists of analysing the contamination chain by carrying out counts of butyric acid bacteria spores on silage, cow dung, and milk.

butyric acid bacteria spores — counts — bias — milk — cow dung

INTRODUCTION

La réduction à la ferme de la contamination butyrique des laits est d'autant plus efficace qu'il est possible d'établir un diagnostic sûr. Plus précisément, il est important de pouvoir apprécier les risques respectifs liés aux contaminants (ensilage, bouse) et à l'hygiène des animaux et de la traite (Baraton, 1985). Le manque de cohérence fréquemment constaté par les techniciens entre les dénombrements de spores butyriques réalisés sur les différents produits de la chaîne de contamination (ensilage, bouse, lait) limite cette possibilité.

La représentativité des prélèvements ou les conditions de conservation des échantillons peuvent être en cause. Ainsi Baraton (1987) a montré que les dénombrements des spores butyriques dans les bouses étaient 2 fois plus élevés lorsque les échantillons avaient été congelés.

La méthode d'analyse peut aussi jouer un rôle. D'une part, elle ne donne qu'une estimation du nombre le plus probable et il faut tenir compte d'un intervalle de confiance important. D'autre part, lors de l'analyse du lait, l'introduction de celui-ci dans le milieu de culture au lactate provoque une modification de composition par apport de lactose et de protéines. Il en résulte une perte de sélectivité du milieu qui risque d'introduire un biais dans les résultats. Cet inconvénient a déjà été mentionné par Bergère *et al.* (1968). Cette modification n'a pas lieu lors de l'analyse de contaminants du lait, et notamment de bouse.

Le but de cet essai est d'étudier l'importance de ce biais et ses conséquences pratiques pour l'analyse de la chaîne de contamination butyrique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Principe de l'étude

Afin d'éliminer les discordances possibles entre les dénombrements réalisés sur les contaminants et sur le lait, les macérations et les dilutions nécessaires aux analyses ont été effectuées dans les 2 cas avec du lait stérile.

Cette pratique expérimentale a été comparée à la méthode habituelle (témoin) qui consiste à utiliser de l'eau stérile (ou du Ringer) comme milieu de dilution.

Toutes les analyses ont été effectuées par la méthode en milieu de culture liquide au lactate de Bryant & Burke modifiée par Bergère (CNERNA, 1986).

Schéma expérimental

Deux essais ont été conduits en utilisant, d'une part la bouse qui constitue le principal contaminant naturel du lait, d'autre part la boue de bactofugation qui est représentative de l'ensemble des contaminations naturelles.

Au total, 8 échantillons (2 contaminants et 6 de laits contaminés) ont été constitués selon le schéma représenté Tableau I.

Chaque échantillon a été analysé avec comme diluant d'une part (méthode expérimentale) du lait stérile, d'autre part (méthode témoin) de l'eau stérile. Chaque analyse a été répétée 15 fois.

Echantillonnage

L'échantillon de bouse a été constitué à partir de 2 exploitations distribuant une ration à base d'ensilage de maïs. La boue de bactofugation a été fournie par une fromagerie (lait de mélange).

Les 6 laits ont été constitués à partir de lait entier UHT dont l'absence de contamination a été préalablement vérifiée (moins de 20 spores/l).

Tableau I. Composition des échantillons.

	Essai N°1	Essai N° 2
Contaminants	Boue	Boue de bactofugation
	1 g de contaminant/litre Lait 1B	34 ml de contaminant/litre Lait 1bb
Laits contaminés : Lait stérile +	0,1 g de contaminant/litre Lait 2B	6,8 ml de contaminant/litre Lait 2bb
	0,01 g de contaminant/litre Lait 3B	1,36 ml de contaminant/litre Lait 3bb

Les analyses

Les dilutions pratiquées et les nombres de tubes utilisés ont été les suivants :

- boues : 5 fois 3 tubes à des dilutions décimales de -2 à -6;
- boues de bactofugation : 5 fois 3 tubes à des dilutions décimales de -1 à -5;
- laits 1 : 3 fois 5 tubes à des dilutions décimales de -1 à -3;
- laits 2 et 3 : 3 fois 5 tubes à des dilutions décimales de 0 à -2.

Les tubes ont été jugés positifs lorsque le bouchon de paraffine était totalement décollé du milieu et le nombre de spores butyriques a été obtenu par la méthode du nombre le plus probable (NPP), en utilisant les tables de De Man (CNERNA, 1986).

Traitement des données

Tous les calculs ont été effectués sur les logarithmes décimaux des nombres de spores.

Une analyse de variance a été effectuée pour tester l'influence de la méthode d'analyse (expérimentale, témoin), du niveau de contamination (L_1 , L_2 , L_3) et l'interaction de ces 2 variables sur le dénombrement des spores.

Les contaminations théoriques des laits, calculées en fonction de la quantité introduite et de

la charge en spores butyriques de leurs contaminants, ont été considérées comme non significativement différentes des contaminations réellement observées lorsqu'elles restaient situées à l'intérieur des intervalles de confiance calculés pour un risque de 5%.

RÉSULTATS

Répétabilité des analyses (Tableau II)

Les variances des analyses répétées 15 fois sur 16 échantillons (Tableau II) ne sont pas homogènes, avec des extrêmes à 0,025 et à 0,225 (différence hautement significative à $P < 0,001$).

La répétabilité est moins bonne pour les dénombrements sur les contaminants, qui nécessitent un grand nombre de dilutions successives, que sur les laits. Pour ceux-ci, elle est d'autant plus faible que les échantillons sont moins contaminés (Lait 3).

En revanche, on ne note pas de différence sensible de la répétabilité en fonction du type de contaminant ou en fonction du type de diluant.

Tableau II. Variance moyenne du dénombrement des spores butyriques selon les différents types d'échantillons.

Echantillons	Nombre de séries d'analyses	Moyenne des variances	Valeurs extrêmes des variances
Laits 1	4	0,052	0,027–0,079
Laits 2	4	0,072	0,026–0,135
Laits 3	4	0,107	0,033–0,225
Contaminants	4	0,135	0,087–0,161
Bouses	2	0,143	
Boues de bactofugat	2	0,125	
Laits avec bouse	6	0,060	0,027–0,135
Laits avec boue de bactofugat	6	0,095	0,026–0,225
Avec diluant eau	8	0,081	0,026–0,225
Avec diluant lait	8	0,102	0,027–0,161

Effets de la méthode d'analyse (Tableaux III et IV)*Effet sur les contaminants*

En utilisant le lait comme support de dilution, les résultats de dénombrements obtenus pour la bouse et pour la boue de bactofugation sont respectivement 6 et 5 fois plus élevés que ceux obtenus par l'analyse classique (différence hautement significative à $P < 0,01$).

Effet sur les laits

Pour les laitsensemencés avec de la bouse ($L_1 + L_2 + L_3$), l'effet de la méthode d'analyse sur le résultat du dénombrement est significatif ($P < 0,05$) : en moyenne, le nombre de spores obtenu avec du lait stérile comme support de dilution (19 300 spores/l) est double de celui obtenu par la méthode de référence (10 200 spores/l). En revanche, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les laitsensemencés avec du bactofugat.

Tableau III. Influence de la méthode d'analyse sur les résultats de dénombrement des spores butyriques dans des échantillons de bouses et de laits contaminés avec des bouses (Essai n° 1).

Type d'échantillon	Méthode expérimentale (dilutions sur lait)		Méthode témoin (dilutions sur eau)	
Bouse (spores/g)	120 000		18 000	
Laits (spores/l)	Contamination théorique	Contamination observée	Contamination théorique	Contamination observée
LB1	120 000	264 200	18 000	58 900
LB2	12 000	18 930	1 800	11 050
LB3	1 200	1 440	180	1 630

Tableau IV. Influence de la méthode d'analyse sur les résultats du dénombrement des spores butyriques dans des échantillons de boues de bactofugation de laits contaminés avec ces boues (Essai n° 2).

Type d'échantillon	Méthode expérimentale (dilutions sur lait)		Méthode témoin (dilutions sur eau)	
Bactofugat (spores/l)	675 000		118 000	
Laits (spores/l)	Contamination théorique	Contamination observée	Contamination théorique	Contamination observée
Lbb1	22 950	11 900	4 010	11 670
Lbb2	4 590	2 990	800	2 040
Lbb3	920	490	160	490

Interaction du niveau de contamination et de la méthode d'analyse

Elle n'a d'effet significatif sur le résultat du dénombrement que pour les laits contaminés avec de la bouse ($P < 0,05$). L'augmentation des résultats, lorsque le lait est utilisé comme support de dilution, est d'autant plus forte que le niveau de contamina-

tion du lait est élevé (Tableau III). Les nombres de spores obtenus sont multipliés par 5 pour LB₁ (264 200 *versus* 58 900 spores/l), par 2 pour LB₂ (18 930 *versus* 11 050), mais sont sensiblement égaux pour LB₃ (1 440 *versus* 1 630) (Fig. 1).

Pour les laits contaminés avec du bactofugat, aucune interaction n'a été mise en évidence.

Fig. 1. Interaction du niveau de contamination du lait par des boues et du milieu de dilution de l'échantillon sur le résultat du dénombrement.

fig mal
fiducie
lettres trop
petites

Comparaison des résultats du dénombrement et de la contamination théorique des laits (Tableaux III et IV)

Quelle que soit la nature du contaminant, les résultats des dénombrements des spores butyriques dans le lait réalisés par la méthode de référence (diluant : eau) sont significativement différents ($P < 0,05$) du nombre théorique, sauf pour le lait Lbb₃ qui a la plus grande variance. En revanche, aucune différence significative ($P < 0,05$) entre contamination théorique et observée n'a été mise en évidence lorsque les dénombrements ont été effectués en utilisant du lait stérilisé comme support de dilution.

Enfin, les résultats des dénombrements réalisés en utilisant l'eau comme support de dilution (méthode témoin) ne sont pas significativement différents ($P < 0,05$) des chiffres de contamination théorique des laits calculés à partir du dénombrement obtenu sur les contaminants en utilisant le lait comme support de dilution.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ces résultats montrent que la nature du diluant (lait ou eau) influence les résultats du dénombrement des spores butyriques sur les contaminants et sur les laits contaminés avec de la bouse. On peut penser que la présence de lait entraîne une surestimation des résultats de l'analyse du fait d'une perte de sélectivité du milieu de culture en lactate de Bryant & Burkey, qui a déjà été signalée par ailleurs (Bergère *et al.*, 1968). Sur le lait contaminé par les bouses, la différence est d'autant plus marquée que le niveau de contamination est plus élevé et nécessite donc un

nombre de dilutions, avec du lait ou de l'eau selon le cas, plus important. Le fait qu'aucune différence n'ait été mise en évidence dans le cas des échantillons de lait contaminés avec de la boue de bactofugation peut s'expliquer par les niveaux de contamination plus faibles de ces échantillons. On ne peut exclure toutefois que les différences de comportement vis-à-vis de la méthode d'analyse de ces 2 catégories d'échantillon proviennent de différences dans la population des espèces de *Clostridia* présentes dans ces 2 produits.

Avec l'analyse habituelle (diluant : eau), les contaminations du lait se trouvent surestimées par rapport à celle de leur contaminant et donc par rapport à leurs contaminations théoriques calculées. Dans ce cas, la surestimation dans la contamination du lait entraîne donc une incohérence avec les résultats des analyses sur les contaminants. Cette surestimation est d'autant plus forte que le lait est moins contaminé, tout au moins dans le cas des bouses. Cela pourrait résulter du fait que pour les faibles contaminations, c'est essentiellement la première série de tubesensemencée avec des laits non dilués (1 ml par tube) qui est susceptible de donner des résultats positifs. La contamination d'un lait faiblement contaminé semble donc, dans la pratique, surestimée par rapport à la contamination d'un lait fortement contaminé. Les contaminations plus faibles réalisées avec le bactofugat et le coefficient de dilution plus réduit d'un lait à l'autre peuvent expliquer que ce phénomène ne soit pas apparu dans l'essai n° 2.

Avec la méthode expérimentale (diluant : lait) au contraire, toutes les contaminations théoriques des laits calculées à partir de celles observées sur les contaminants se trouvent situées à l'intérieur des intervalles de confiance des contaminations réellement obtenues. Lorsque le lait est utilisé comme support de dilution, il n'y a

donc pas d'incohérence entre les résultats du lait et ceux des produits contaminants, qui sont en fait tous surestimés par rapport à la contamination réelle en *Clostridium* fermentant le lactate.

Sur le plan pratique, 2 voies apparaissent possibles pour améliorer la cohérence des résultats de dénombrement des spores butyriques sur les contaminants et sur les laits.

On peut tout d'abord envisager d'utiliser la méthode classique, mais en appliquant des corrections systématiques aux résultats des laits. La relation entre la contamination théorique et le résultat de l'analyse (exprimée en unités logarithmiques) semble en effet être linéaire dans l'essai n° 1 avec la bouse, et l'on pourrait donc envisager de calculer le risque réel, c'est-à-dire la contamination théorique, par régression. A ce propos, une étude (Chamba, 1980) rapporte qu'avec des rations où l'ensilage domine, il existe une bonne corrélation sur les laits d'un groupe d'exploitations entre la contamination en *Clostridium tyrobutyricum* et la contamination en butyriques totaux (analyse classique). Toutefois, la régression est différente entre le groupe des exploitations distribuant de l'ensilage d'herbe et celui distribuant du maïs. Par ailleurs, la variabilité des résultats ne permet pas d'appliquer avec fiabilité cette correction pour le lait d'une exploitation particulière. Cette voie paraît donc peu praticable.

Il paraît donc préférable, pour évaluer le potentiel butyrique d'une exploitation ou dans le cadre d'une étude spécifique de la «chaîne de contamination», d'utiliser du lait stérile comme diluant pour effectuer les dénombrements de spores butyriques en amont du lait (ensilage, bouse), ce qui revient pratiquement à ajouter du lait stérile au milieu de culture à raison de 10% (v/v). Cette solution reste toutefois un pis-aller car elle diminue la sélectivité des analyses

vis-à-vis des espèces réellement dangereuses qui, dans les bouses par exemple, pourraient être en proportions variables selon le régime alimentaire (Chamba, 1980). On pourrait également envisager de remplacer le lait stérile par un milieu de culture contenant du glucose au lieu de lactate comme le milieu RCM (Hirsch & Grinstead, 1954), sous réserve d'une vérification préalable de la cohérence des résultats.

On pourrait aussi s'inspirer de la méthode hollandaise de Van Beynum & Pette (Stadhouders *et al.*, 1985), qui utilise le lait additionné de glucose et acidifié à pH 5,45.

L'analyse des laits correspondants pourrait continuer à être effectuée selon la méthode habituelle (milieu de Bryant & Burkey — eau stérile) sans que cela entrave notablement la cohérence des résultats, puisque les contaminations théoriques des laits déduites des dénombrements réalisés sur les contaminants par la méthode expérimentale restent incluses dans les intervalles de confiance des contaminations observées sur ces laits avec la méthode témoin.

Cette proposition doit être vue comme un palliatif dans l'attente de méthode(s) permettant de dénombrer spécifiquement les spores de *Clostridium tyrobutyricum*.

REMERCIEMENTS

Je remercie G. Le Garff (ITEB) et C. Drogeat (ACTA) pour l'aide apportée au dépouillement des résultats, F. Serieys (ITEB) et J.L. Bergère (INRA) pour leurs conseils de rédaction du manuscrit, ainsi que F. Moalic (Laboratoire interprofessionnel de Haute-Marne), grâce auquel ce travail a pu être réalisé.

RÉFÉRENCES

- Baraton Y. (1985) Limiter la contamination butyrique dans une exploitation. In : *Le Point Sur les Butyriques*. ITEB, Paris, pp. 21-30
- Baraton Y. (1987) Influence du mode de conservation des échantillons sur le résultat du dénombrement des spores butyriques. (Compte rendu d'étude non publié)
- Bergère J.L., Gouet P., Hermier J. & Mocquot G. (1968) Les *Clostridium* du groupe butyrique dans les produits laitiers. *Ann. Inst. Pasteur* 19, 41-54
- Chamba F. (1980) Comparaison de la contamination butyrique observée dans les fourrages, les bouses et le lait avec différents régimes. In : *Compte Rendu d'Essai ITG—ITEB*. ITG, S80/3/A, Bourg
- CNERNA (Commission Qualité Bactériologique) (1986) Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de *Clostridia*. *Rev. Lait Fr.* 451, 39-45
- Hirsch A. & Grinsted E. (1954) Methods for the growth enumeration of anaerobic spores. Formers from cheese with observations on the effect of nisin. *J. Dairy Res.* 21, 101-110
- Stadhouders J., Hup G. & Nieuwenhof F.F. (1985) Silage and cheese quality. *Nizo Mededeling M* 19 A, 1-40