

BOUILLON DE BRYANT ET BURKEY MODIFIE BERGERE AVEC RESAZURINE

DENOMBREMENT DES SPORES DE *CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM*

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon de Bryant et Burkey modifié par Bergère est utilisé pour la numération des spores de *Clostridia* fermentant le lactate dans le lait et les produits laitiers. Il permet notamment de mettre en évidence *Clostridium tyrobutyricum* qui est responsable du gonflement tardif "late blowing" des fromages tels que : Gruyère, Emmental, Gouda, Edam, Cheddar ou Parmesan. L'apparition de la défectuosité est principalement liée au nombre de spores présentes dans le lait de fabrication. Ce nombre dépend surtout du type d'aliment distribué aux animaux, la source principale de contamination étant l'ensilage.

2 HISTORIQUE

Originellement décrit par Bryant et Burkey, le milieu a été modifié par Bergère qui, en 1968, réalisant une étude sur le rôle des ensilages dans la contamination butyrique du lait, fit clairement la distinction entre *Clostridium butyricum* et *Clostridium tyrobutyricum*, ce dernier microorganisme étant l'agent principal de l'altération des fromages.

3 PRINCIPES

La Tryptone, les extraits de viande et de levure ainsi que la cystéine constituent des substrats nutritifs nécessaires à la multiplication rapide de *Clostridium tyrobutyricum* en anaérobiose.

L'acétate de sodium est le principal promoteur de la germination des spores, par ailleurs activées par un chauffage à 75°C qui assure simultanément la destruction des formes végétatives.

La résazurine, indicateur d'oxydo-réduction, doit rester incolore après le chauffage de l'inoculum dans le milieu. Un virage au rose permet de déceler l'élévation éventuelle de la teneur en oxygène. Les tubes devenant roses ne doivent pas être pris en considération dans l'analyse des résultats.

La fermentation du lactate en présence d'acétate se traduit par l'apparition de gaz (hydrogène + dioxyde de carbone). Le dégagement gazeux est visualisé au moyen d'un bouchon de paraffine qui se soulève.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 15,0 g
- Extrait autolytique de levure..... 5,0 g
- Extrait de viande 7,5 g
- Cystéine (chlorhydrate) 0,5 g
- Lactate de sodium..... 5,0 g
- Acétate de sodium 5,0 g
- Résazurine 2,5 mg

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 5,9 ± 0,2.

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 38,0 g de milieu déshydraté (BK141) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes 16 x 160 mm à raison de 10 mL par tube.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir jusqu'à température ambiante.

✓ **Reconstitution :**
38,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

6 MODE D'EMPLOI

- Ensemencer 1 mL d'inoculum dans les tubes ainsi préparées et de chacune de ses dilutions décimales, en méthode NPP.
- Couler 2 mL de paraffine (58-60 °C) fondue, préalablement stérilisée à 121 °C pendant 15 minutes.
- Chauffer les tubes dans un bain thermostaté à 75 °C pendant 15 minutes, afin de détruire les formes végétatives et d'activer les spores.
- Laisser refroidir de manière à solidifier la paraffine.
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant 7 jours.

✓ **Ensemencement :**
1 mL/tube NPP

✓ **Incubation :**
7 jours à 37°C

NOTE :

Si, avant utilisation, le milieu présente une coloration rose (signe d'oxydation) de plus de 1/3 de la hauteur à partir de la surface, les conditions d'anaérobiose peuvent être restituées en chauffant le milieu (100 °C pendant 20 minutes). Ne pas effectuer cette opération plus d'une fois.

7 LECTURE

Considérer comme positifs, les tubes présentant une croissance et un dégagement gazeux qui soulève le bouchon de paraffine.

Faire la numération en utilisant la méthode du "nombre le plus probable".

Ce milieu électif n'étant pas totalement spécifique, seule une identification des colonies isolées à partir des tubes positifs permet de confirmer la présence réelle de *Clostridium tyrobutyricum*. Néanmoins la mise au point de la formule cible de façon prioritaire ce microorganisme. L'expérience prouve que les résultats obtenus sont en étroite corrélation avec les défauts de fabrication constatés en industrie fromagère.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre blanc-crème, fluide et homogène.

Milieu préparé : solution ambrée, limpide, présentant un anneau rosé en surface.

Réponse culturale après 5 jours d'incubation à 37 °C (méthode NPP) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)	Production de gaz
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	CNRZ 500	$P_R \geq 50 \%$	Positive
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	CNRZ 505	$P_R \geq 50 \%$	Positive
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	CNRZ 608	$P_R \geq 50 \%$	Positive

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.

Milieu préparé en tubes ou en flacons (*) : 6 mois à 2-8°C.

Régénérer à 100°C pendant 20 minutes avant d'ensemencer.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté :

Flacon de 500 gBK141HA
Seau de 5 kgBK141GC

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rosenberger, R.F.. 1951. The development of methods for the study of obligate anaerobes in silage. Proceedings of the Society for Applied Bacteriology, **14** : 161-164.
- Bryant, M.P., Kroulik, J.T., Burkey, L.A., and Wiseman, H.G.. 1952. A study of anaerobic bacteria present in grass silage. Bact. proc., **52** : 21-22.
- Bryant, M.P., and Burkey, L.A.. 1953. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in the bovine rumen. Journal of Dairy Science, **36** : 205-217.
- Bryant, M.P., and Burkey, L.A.. 1956. The characteristics of lactate-fermenting sporeforming anaerobes from silage. Journal of Bacteriology, **71** : 43-46.
- Bergère, J.L., Gouet, P., Hermier, J., et Mocquot G.. 1968. Les *Clostridium* du groupe butyrique dans les produits laitiers. Annales de l'Institut Pasteur, Lille, **19** : 41-54.
- Cerf, O., et Bergère, J.L. ; 1968. La numération des spores de *Clostridium* et son application au lait et aux produits laitiers. Numération des différents groupes de *Clostridium*. Le lait, **48** : 501-519.
- Touraille, C., et Bergère, J.L.. 1974. La germination de la spore de *Clostridium tyrobutyricum*. Biochimie, 56 (**3**) : 404-4212.
- Bergère, J.L. Septembre 1979. Développement de l'ensilage. Ses conséquences sur la qualité du lait et des produits laitiers. Revue Laitière Française.
- Frankinet, J. et De Carheil, M.. 1983. Les tests de contrôle des germes butyriques. La technique laitière, **977** : 15-18.
- CNERNA (Commission « Qualité Bactériologique du lait »). Avril 1986. Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de *Clostridia* par la méthode de culture en milieu liquide. Revue Laitière Française, **451** : 39-45.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : BRYANT ET BURKEY_FR_V11
Date création : 12-2001
Date de révision : 05-2018
Motif de révision : Conservation du milieu préparé