Numération des bifidobactéries dans les laits fermentés : proposition pour une méthode microbiologique = Enumeration of bifidobacteria in fermented milks : proposal for a microbiological method

Autor(en): **Chapon, J.-L. / Kiss, Klara**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **82 (1991)**

Heft 3

PDF erstellt am: **31.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982418

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

Trav. chim. aliment. hyg. **82**, 264–277 (1991)
Présenté le 18 février 1991. Accepté le 3 mai 1991

Numération des bifidobactéries dans les laits fermentés
Proposition pour une méthode microbiologique

Enumeration of Bifidobacteria in Fermented Milks
Proposal for a Microbiological Method

J.-L. Chapon et *Klara Kiss*
Ecobion, Laboratoires de Chimie et de Microbiologie appliquée SA, Genève

Introduction

Depuis une cinquantaine d'années, plusieurs produits alimentaires et pharmaceutiques contenant des germes vivants du genre *Bifidobacterium* ont été développés. Ces bactéries sont naturellement présentes en grands nombres dans l'intestin de l'homme et de nombreux animaux (1).

Leur rôle régulateur, comme pour les bactéries lactiques, peut se résumer ainsi:

- adhésion aux cellules épithéliales du tractus intestinal,
- stimulation du péristaltisme intestinal,
- production d'acides organiques à partir de la fermentation des sucres, acide lactique mais aussi acide acétique. En effet, la fermentation du glucose par la voie du fructose – 6 – phosphate est une particularité des bifidobactéries qui conduit théoriquement à 3 moles d'acide acétique et 2 moles d'acide lactique pour 2 moles de glucose.
- inhibition de certaines bactéries entéropathogènes *(Salmonella, Shigella, E. coli)* grâce en partie à cette acidification et aussi aux bactériocines produites par les bactéries lactiques.
- compétition avec la flore putréfiante des *Clostridium.*

Ces propriétés ont été utilisées depuis les années 1950/1960 en administrant d'abord des facteurs bifidigènes puis des bifidobactéries vivantes, aux enfants et aux adultes souffrant de désordres intestinaux (2).

Des travaux plus récents montrent que certaines espèces de bifidobactéries exerceraient également une action anti-tumorale et hypocholestérolémiante (3).

Outre tous ces avantages physiologiques, les bifidobactéries permettent du point de vue gustatif, de proposer aux consommateurs des yogourts plus «doux».

Pour toutes ces raisons plus d'autres purement économiques, ces bactéries sont de plus en plus largement utilisées dans l'industrie alimentaire, particulièrement l'industrie laitière qui offre aux consommateurs des fromages à pâte molle, et toute une série de yogourts, fermes, brassés, aux fruits, contenant des bifidobactéries.

Ces laits fermentés représentent depuis 2 ou 3 ans la plus grosse part de ce marché, et chaque fabricant présente dans sa gamme de yogourts, un ou plusieurs produits contenant des bifidobactéries.

C'est le cas notamment des Laiteries réunies de Genève qui nous ont mandaté pour développer sur leurs produits, une méthode utilisable en routine pour la numération des bifidobactéries.

Ainsi, depuis le printemps 1988, tant au cours de la phase de mise au point du processus de fabrication et du produit lui-même, qu'au niveau du contrôle de routine sur le produit fini, les Laiteries réunies de Genève ont toujours eu le souci de «suivre» l'évolution de la population des bifidobactéries dans leurs produits jusqu'à la date de péremption.

L'intérêt de ces nouveaux produits et leur principal argument de vente étant la présence de bifidobactéries vivantes, il semble en effet assez logique:

1. de pouvoir prouver que ces bactéries sont présentes dans le produit durant toute sa phase de vente,
2. de fixer une limite quantitative à partir de laquelle la mention du genre *Bifidobacterium* (souvent improprement raccourcie à Bifidus, de l'ancienne dénomination *Lactobacillus bifidus)* puisse être utilisée, de la même façon qu'il existe une limite minimum pour le nombre des bactéries lactiques du yogourt.

Le travail présenté décrit le développement d'une méthode analytique qui a été évaluée lors d'essais comparatifs inter-laboratoires.

Matériel et méthode

Souches utilisées

Les souches bactériennes utilisées dans cet essai sont les cultures utilisées par les Laiteries réunies de Genève. Elles proviennent des laboratoires Wiesby (D-Niebull). La bifidobactérie est une souche de *Bifidobacterium infantis* d'origine humaine. D'autres souches de bifidobactéries sont actuellement testées.

Laits fermentés analysés

- *55 yogourts achetés sur le marché suisse* et provenant de 6 autres fabricants. Ces yogourts, nature ou avec des fruits, sont analysés au cours de leur période de vente. Les résultats de ces numérations sont récapitulés dans la figure 1.
- *110 échantillons de yogourt nature ferme «Cristallina»* provenant des Laiteries réunies de Genève, analysés
  - à la réception (en moyenne 2 jours après la production)
  - à la péremption (soit le jour du data, soit 1 jour avant ou 1 jour après).

  Ces 220 numérations sont résumées sous forme d'histogramme dans la figure 2.

Préparation des échantillons

Les méthodes utilisées sont celles décrites dans le chapître 56 du Manuel suisse des denrées alimentaires:
- pesée aseptique d'une partie représentative de 10 g d'échantillon
- remise en suspension avec 90 ml de diluant
- homogénéisation par simple agitation du flacon de suspension 1/10ème durant 30 secondes
- dilutions décimales
- distribution en boîte de Pétri de 9 cm Ø
- homogénéisation avec le milieu de culture autoclavé et refroidi à 48 °C
- incubation en anaérobiose à 37 °C pendant 3 à 5 jours.

Méthode analytique

Sélectivité de la méthode

Les conditions expérimentales, pH du milieu, substances réductrices, sucres et facteurs bifidigènes, permettent une bonne croissance de la souche *Bifidobacterium infantis*. La sélectivité est obtenue grâce à des antibiotiques et agents bactériostatiques choisis parmi ceux décrits dans la littérature (4, 5) et en fonction de nos propres essais avec les ferments utilisés aux Laiteries réunies de Genève (tableau 1).

1. Réactifs et milieux de culture

- Columbia Agar Base (BBL 11124)
- MRS Agar (Merck 10660)
- MRS Bouillon (Merck 10661)
- RCM Agar milieu pour Clostridies (Merck 5411)
- M-17 Agar (Merck 15108)
- Glucose (Merck 8346)
- Chlorhydrate de L-cystéine (Merck 2839)
- Chlorure de lithium (Merck 5679)
- Sulfate de néomycine (Fluka 72137)
- Acide nalidixique (Fluka 70162)
- Sulfate de Paromomycin (Humatin Parke-Davis 250 mg – lot n° 0367038)
- Acide propionique (Merck 800605)
- Hydroxyde de sodium (Merck 6498)
- Peptone de caséine (Merck 7213)
- Tween^{R} 80 (Merck 822187)
- Dihydrogénophosphate de potassium (Merck 4873)
- Hydrogénophosphate de di-sodium (Merck 6580)

2. Solution tampon

	KH_2PO_4/l	$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$/l
• STP (solution tampon phosphate) pH 8,0 M/15	0,499 g	11,22 g

3. Méthode Ecobion 1

Diluant	Tween[R] 80	→	1 g
	Peptone de caséine	→	1 g
	STP pH 8,0 M/15	→	1000 ml

Ce diluant est réparti en flacons de 90 ml autoclavés 20' à 121 °C, le jour de l'analyse. Avant utilisation, chaque flacon et tube reçoivent 0,3% m/v de L-Cyst. HCl stérilisé par filtration.

Gélose	Columbia Agar Base	→	45 g
	Tween 80	→	1 g
	Glucose	→	50 g
	STP pH 8,0 M/15	→	1000 ml

Après stérilisation et refroidissement à 48 °C, sont rajoutés la substance réductrice et le mélange antibiotique AB_1, sous forme de solutions stérilisées par filtration (0,22 μ):

– L-cyst. HCl	→	3 g/l	Concentrations finales
– Chlorure de lithium	→	3 g/l	
– Sulfate de néomycine	→	30 mg/l	
– Sulfate de paramomycin	→	50 mg/l	
– acide nalidixique	→	15 mg/l	

4. Méthode Ecobion 2

– Même diluant et même gélose sauf moindre quantité de glucose (20 g/l) ajoutée après stérilisation et refroidissement du milieu de culture, sous forme d'une solution stérilisée par filtration.
– Mélange antibiotique simplifié AB_2

– Chlorure de lithium	→	3 g/l	Concentrations finales
– Sulfate de néomycine	→	100 mg/l	

Reproductibilité de la méthode analytique

Evaluation du milieu

Soucieux de proposer une méthode de contrôle des bifidobactéries à ses affiliés, l'Inspectorat Cristallina de l'Union centrale des producteurs de laits à Berne a organisé 4 essais inter-laboratoires afin de valider cette méthode.

– *3 laboratoires participent au 2 premiers essais:*

1 FAM [laboratoire de la section de microbiologique de la Station fédérale de recherche laitière au Liebefeld, sous la responsabilité de M. Grand.

2 IMB [le laboratoire de l'Intermilch AG de Berne, sous la responsabilité de Dr Meier et M. Pfäffli
3 ECO [le laboratoire Ecobion

Les méthodes Ecobion 1 et RCM (Tableau 2), puis Ecobion 2 et Beerens (Tableau 3) sont successivement comparées. La méthode du professeur Beerens utilise également un milieu Columbia glucosé et cystéiné dans lequel la sélectivité est obtenue par l'addition d'acide propionique et l'ajustement du pH à 5.

– *Les laboratoires FAM et Ecobion participent aux 2 essais suivants.* La méthode Ecobion 2 est utilisée sur différents yogourts du marché suisse (Tableau 4).

Identification des bifidobactéries

Les analyses étant faites sur des yogourts dont la flore lactique est connue (généralement *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus bulgaricus* et/ou *Lactobacillus acidophilus)*, l'identification des colonies de *Bifidobacterium* est faite par simples examens microscopiques.

Examen direct entre lame et lamelle en contraste de phase

Les bifidobactéries, bacilles non mobiles et non sporulés, apparaissent le plus souvent en petits amas formant des «bouquets» de bâtonnets parfois renflés, parfois divisés en Y, alors que les lactobacilles gardent une forme de bâtonnets plus ou moins longs, ou sont quelques fois en vrilles, et que les streptocoques forment des chaînettes plus ou moins étirées de coques ronds à ovales.

Examen après fixation et coloration de Gram

Les bifidobactéries sont Gram positives comme les lactobacilles et les streptocoques. Les formes renflées ou divisées sont davantage visibles qu'à l'examen direct et les amas font penser à des idéogrammes chinois.

Résultats

Sélectivité de la méthode analytique

Après avoir utilisé dans la méthode 1 le mélange d'antibiotique décrit dans le milieu NPNL de *Teraguchi* (7), nous avons simplifié sa préparation en ne gardant qu'un aminoside et le chlorure de lithium. Ce mélange AB2 a été testé sur des cultures congelées provenant de Wiesby et remises en suspension (1 g/10 ml) dans du bouillon MRS cystéiné à 0,3% m/v.

Dans le tableau 1, les résultats des numérations faites avec et sans antibiotique montrent que les ferments généralement utilisés dans les yogourts sont inhibés par ce mélange AB2 qui permet une croissance sélective de *Bifidobacterium infantis*. Ces résultats obtenus sur des cultures pures n'ont pas été infirmés lors des contrôles de routine sur les yogourts de Laiteries réunies.

Tableau 1. Activité inhibitrice du mélange antibiotique sur les différentes cultures présentes dans les laits fermentés

Nombre de germes par gramme de ferment congelé			
Milieux de culture	Ferments du yogourt	Bifidobacterium infantis	Lactobacillus acidophilus
Ecobion 2 sans AB	$2{,}50 \times 10^7$/g Ex. Mi. = 3 strepto./3 à -5 et -6	$1{,}07 \times 10^9$/g Ex. Mi. = 6 Bif./6 à -7	$2{,}40 \times 10^8$/g Ex. Mi. = 3 Lacto./3 à -7
Ecobion 2 + AB	$< 10^1$/g	$6{,}90 \times 10^8$/g Ex. Mi. = 3 Bif./3 à -6 et -7	$< 10^1$/g
Ex. Mi. = Examen microscopique de contrôle (examen direct et / ou coloration de Gram)			

Ainsi, depuis 2 ans cette méthode nous a permis de dénombrer des colonies bactériennes homogènes de 2 à 3 mm de diamètre après 3 jours d'incubation à 37 °C en anaérobiose, et ceci sans la gêne de colonies parasites aux dilutions -3, -4, -5, -6.

La figure 1, récapitule les moyennes obtenues de cette façon sur différents produits du marché suisse. Selon les fabricants, elles s'échelonnent de quelques centaines ou quelques dizaines de milliers à plusieurs millions de bifidobactéries par gramme. Etant donné le nombre assez faible d'échantillons analysés (de 3 à 18 suivant les provenances si l'on excepte les Laiteries réunies), la diversité des produits (yogourts natures, aux fruits, fermes ou brassés) et le fait que l'analyse ait eu lieu à n'importe quel moment dans la période de vente, il ne faut considérer ces résultats moyens et leur intervalle de confiance que comme de simples indications sur la disparité des yogourts proposés au consommateur quant à leur contenu en bifidobactéries vivantes.

La figure 2, récapitule les résultats obtenus pour les Laiteries réunies de Genève. Sur 220 contrôles effectués sur des yogourts nature fermes 110 à la réception et 110 à la péremption, le nombre moyen de *Bifidobacterium* par gramme de yogourt est de 5,57 millions, l'intervalle de confiance de la moyenne au risque 5% allant de 4,95 à 6,18 millions par gramme.

Les moyennes à la réception et à la péremption sont respectivement de 6,40 et 4,76 millions de *bifidobactéries* par gramme, soit une diminution de 25% en l'espace de 3 semaines de stockage environ à +4/+5 °C.

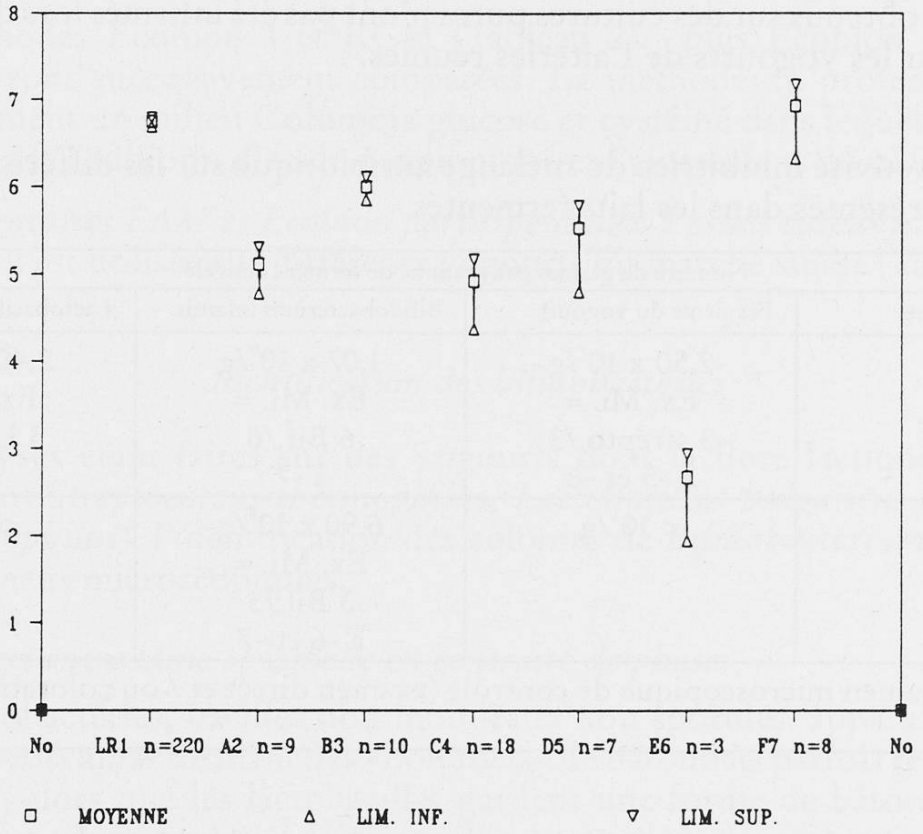

Fig. 1. Numération des bifidobactéries dans différents yogourts du marché
Moyennes et limites de confliance de la moyenne au risque 5%
Axe des X = Différents fabricants (LR1 - A2...) Nombre d'échantillons analysés (n = 220...)
Axe des Y = Log 10 du nombre de bifidobactéries par gramme de yogourt

Essais comparatifs inter-laboratoires

1er essai: 2 méthodes sont comparées.

1. La méthode utilisant l'Agar RCM (Reinforced Clostridial Medium). Ce milieu, non sélectif, destiné à la numération des clostridies, est additionné de 1,5% d'Agar, les dilutions sont faites en sérum physiologique, les boîtes de Pétri sont incubées en anaérobiose pendant 5 jours.
2. La méthode Ecobion 1
   Les 3 laboratoires analysent 4 yogourts de 2 provenances différentes, 2 nature et 2 contenant des fruits.

Le tableau 2 montre que les résultats des 3 laboratoires se recoupent bien, particulièrement avec la méthode Ecobion. (Entre les résultats des laboratoires FAM et Ecobion, les coefficient de corrélation [r = 0,986] dépasse la limite de signification au risque 5%.)

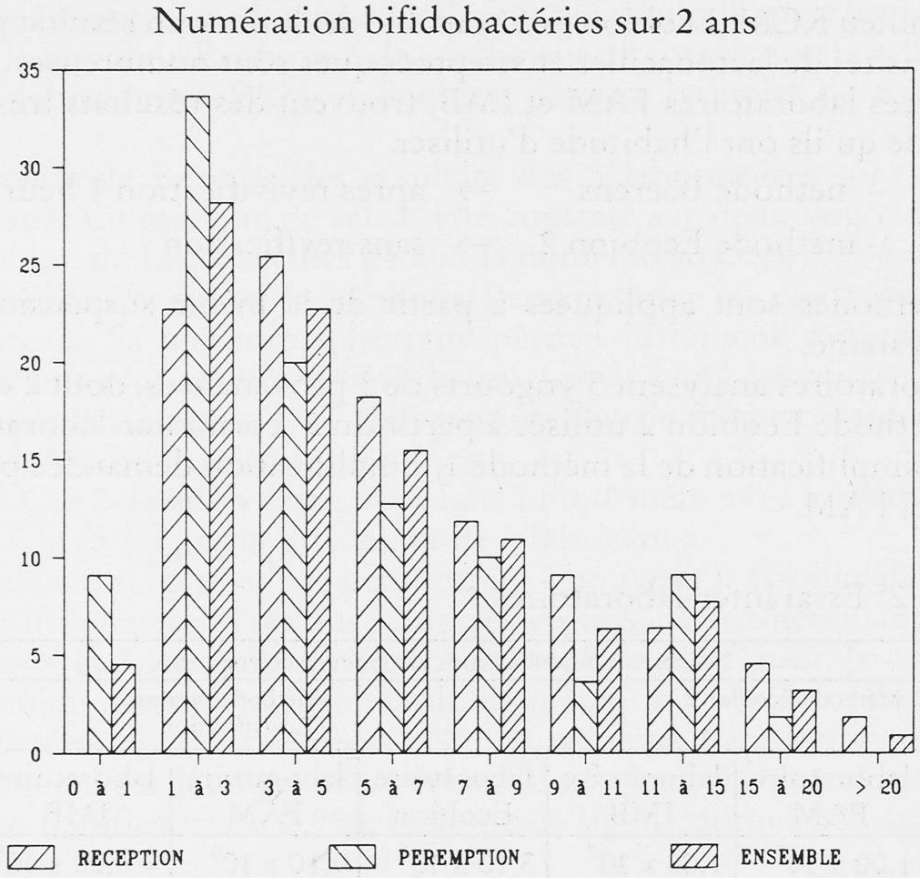

Fig. 2. Nombre de bifidobactéries par gramme de yogourt Cristallina 220 analyses (110 à la réception/110 à la péremption)
Axe des X = Différentes classes en millions de bifidobactéries/gramme
Axe des Y = Pourcentage de résultats dans chaque classe

Tableau 2. 1er Essai inter-laboratoires

	Nombre de bifidobactéries par gramme de produit					
	Milieu Ecobion 1			Milieu FAM-IMB		
Echantillons de yogourts	laboratoire FAM	laboratoire IMB	laboratoire Ecobion	laboratoire FAM	laboratoire IMB	laboratoire Ecobion
N 1 →LR Nature	$1{,}50 \times 10^7$	$2{,}00 \times 10^7$	$1{,}55 \times 10^7$	$2{,}70 \times 10^7$	$2{,}00 \times 10^7$	$\geq 10^5$
N 2 →A Nature	$5{,}70 \times 10^7$	$4{,}00 \times 10^7$	$3{,}70 \times 10^7$	$7{,}60 \times 10^7$	$4{,}00 \times 10^7$	$\geq 10^6$
N 3 →A Pêche Melon	$3{,}60 \times 10^5$	$3{,}00 \times 10^4$	$2{,}50 \times 10^5$	$8{,}00 \times 10^5$	$7{,}00 \times 10^5$	10^4 à 10^5
N 4 →A Pêche Framb. groseilles	$3{,}10 \times 10^5$	$3{,}00 \times 10^4$	$2{,}90 \times 10^5$	$4{,}00 \times 10^5$	$7{,}00 \times 10^5$	10^4 à 10^5
Commentaires des trois laboratoires	Colonies isolées, de 2 à 3 mm Ø Pas de colonies parasites			Beaucoup de colonies parasites Nécessité de faire un grand nombre d'examens microscopiques sur colonies isolées et sur mélanges de colonies en surface		

Avec le milieu RCM, Ecobion est incapable de donner un résultat précis tant les colonies parasites de lactobacilles et streptocoques sont nombreuses.

Les 2 autres laboratoires FAM et IMB, trouvent des résultats très voisins avec cette méthode qu'ils ont l'habitude d'utiliser.

2e essai
} – méthode Beerens → après revivification 1 heure *
} – méthode Ecobion 2 → sans revification

Les 2 méthodes sont appliquées à partir de la même suspension en diluant tamponné cystéiné.

Les 3 laboratoires analysent 5 yogourts de 3 provenances, dont 2 contenant des fruits. La méthode Ecobion 2 utilisée à partir du 2e essai inter-laboratoires correspond à une simplification de la méthode 1, simplification demandée par les laboratoires IMB et FAM.

Tableau 3. 2e Essai inter-laboratoires

Nombre de bifidobactéries par gramme de yogourt						
	Méthode Ecobion 2			+Méthode Beerens + Revivification		
Echantillons de yogourts	laboratoire FAM	laboratoire IMB	laboratoire Ecobion	laboratoire FAM	laboratoire IMB	laboratoire Ecobion
LR Cristallina A Nature	$1{,}00 \times 10^7$ $7{,}50 \times 10^4$	$1{,}00 \times 10^7$ $4{,}00 \times 10^4$	$3{,}10 \times 10^6$ $4{,}30 \times 10^4$	$9{,}10 \times 10^6$ $6{,}50 \times 10^4$	$\approx 6{,}00 \times 10^6$ $\approx 2{,}00 \times 10^4$	$2{,}60 \times 10^6$ 1 $3{,}60 \times 10^4$ 1
A Framb.-Pêche	$1{,}20 \times 10^5$ $3{,}50 \times 10^4$	$8{,}00 \times 10^4$ $2{,}00 \times 10^4$	$1{,}35 \times 10^5$ $1{,}40 \times 10^4$	$\approx 10^5$ $1{,}60 \times 10^4$	non déterminé $\approx 3{,}00 \times 10^4$	$< 10^4$ 3 $1{,}20 \times 10^4$ 2
A Nature B Abricot	$1{,}30 \times 10^6$	$7{,}00 \times 10^5$	$1{,}38 \times 10^6$	$\approx 10^5$	$\approx 2{,}00 \times 10^5$	$3{,}00 \times 10^5$ 3
Commentaires	Les 3 laboratoires remarquent qu'il n'y a pas de colonie parasite Tous les contrôles microscopiques montrent des bifidobactéries Les colonies, après 3 jours d'incubation à 37 °C en anaérobiose, font 2 à 3 mm Ø			Les 3 Laboratoires remarquent: 1 Pas de colonie parasite, mais des colonies plus petites: 0,5 à 1 mm Ø après 5 jours d'incubation en anaérobiose 2 Les colonies de bifidobactéries sont assez grosses: 2 à 3 mm Ø mais parmi 50 à 100 fois plus de petites colonies de Lactobacilles 3 Pour ces 2 yogourts aux fruits, il y a un grand nombre de colonies parasites de lactobacilles qui gênent le dénombrement		

* Des essais préliminaires nous ont conduits à introduire cette «revivification» qui consiste à laisser 1 heure à température ambiante la suspension mère (10 g/90 ml) en diluant Ecobion cystéiné tamponné. Sans cela, la méthode Beerens appliquée telle quelle donnait des résultats quantitatifs 8 fois inférieurs à ceux obtenus avec la méthode Ecobion.

Le tableau 3 montre une bonne corrélation des résultats entre les 3 laboratoires, surtout avec la méthode Ecobion 2 (le coefficient de corrélation [$r = 0{,}95$] entre les résultats des laboratoires FAM et Ecobion dépasse la limite de signification au risque 5%).

Avec la méthode Beerens, les résultats des 3 laboratoires sont un peu plus dispersés à cause du manque de sélectivité constaté sur deux yogourts aux fruits, un grand nombre de Lactobacilles gênant la numération des *bifidobactéries.* Nous utilisons cependant toujours la méthode Beerens pour les contrôles sur certains produits français. Sa moindre sélectivité permet justement son emploi pour la numération d'une plus grande variété de souches de *bifidobactéries.*

A la suite de ces 2 essais, les 3 laboratoires font le même commentaire sur les avantages de la méthode sélective Ecobion.

3e et 4e essais: Ces 2 derniers essais sont faits uniquement avec la méthode Ecobion 2 sur un total de 13 yogourts provenant de 7 fabricants.

Dans le tableau 4, les résultats démontrent à nouveau la fiabilité de l'analyse, les nombres de Bifidobactéries rendus étant très voisins, particulièrement pour la série d'analyses des 4 et 5 septembre 1990 (coefficient de corrélation [$r = 0{,}999$] si l'on excepte le résultat incomplet, la limite de signification à 5% étant de 0,878).

Pour la 2e série du 13 novembre 1990, les résultats Ecobion sont un peu plus élevés, notamment sur les 4 premiers échantillons (le coefficient de corrélation est tout de même significatif: $r = 0{,}995$, la limite de signification à 5% étant ici 0,754).

Tableau 4. 3e et 4e Essais inter-laboratoires avec la méthode Ecobion

Echantillons	Date de péremption	Nombre de bifidobactéries/gramme	
		Laboratoire Ecobion	Laboratoire FAM
Analyses des 4 et 5 septembre 1990			
LR Nature	21.09.1990	$6{,}00 \times 10^6$	$1{,}10 \times 10^7$
A Ananas	28.09.1990	$4{,}60 \times 10^4$	$3{,}80 \times 10^4$
A Myrtille	28.09.1990	$4{,}30 \times 10^4$	$4{,}30 \times 10^4$
A Pêche-Menthe	25.09.1990	$1{,}46 \times 10^5$	$1{,}70 \times 10^5$
C Ananas	10.09.1990	$4{,}90 \times 10^5$	$4{,}10 \times 10^5$
B Acidophilus Myrtille	05.09.1990	$< 10^3$	10^3
Analyses du 13 novembre 1990			
LR Nature	28.11.1990	$5{,}20 \times 10^6$	$2{,}60 \times 10^6$
A Orange	02.12.1990	$9{,}00 \times 10^4$	$2{,}20 \times 10^4$
A Ananas	03.12.1990	$1{,}20 \times 10^5$	$2{,}70 \times 10^4$
B Acidophilus fraise	15.11.1990	$1{,}20 \times 10^6$	$3{,}50 \times 10^5$
E Bifidus fraise	18.11.1990	$6{,}00 \times 10^2$	10^3
D Orange/mandar.	14.11.1990	$8{,}00 \times 10^4$	$6{,}70 \times 10^4$
G framboise	16.11.1990	$1{,}40 \times 10^7$	$9{,}40 \times 10^6$

Discussion

Nos essais préliminaires avec des milieux décrits dans la littérature pour le maintien des souches pures de bifidobactéries ou leur dénombrement, Columbia et MRS Agar modifiés (8), *Bifidobacterium medium* (9), nous ont conduits au choix des conditions expérimentales décrites dans ce travail:

- la solution tampon phosphate pH 8,0 permet d'obtenir une suspension 1/10 du yogourt et un milieu de culture une fois coulé et solidifié avec un pH de 6,8/7 qui convient bien aux bifidobactéries.
- La concentration de 0,3% m/v de chlorhydrate de L-cystéine nous permet de travailler sans rien changer à nos méthodes habituelles (agitation du flacon de suspension mère au 1/10e, dilutions avec passage des tubes 10 secondes au Vortex) sans que l'oxygénation qui en résulte soit dommageable pour les numérations des bifidobactéries qui sont des bactéries classées le plus souvent comme anaérobies strictes.
- Le glucose, fermenté par toutes les espèces de *Bifidobacterium* est choisi comme hydrate de carbone et les facteurs bifidigènes décrits dans la littérature (10, 11) sont, pour la plupart, amenés dans le milieu de culture par les composants de base de la gélose Columbia, riche en peptones (pancréatique de caséine, pepsique de viande), extrait de levure, extrait de viande et fécule de maïs.

Malheureusement, ces différents facteurs favorables à la croissance des bifidobactéries ne sont pas défavorables à celle des bactéries lactiques, et, dans les laits fermentés, les bifidobactéries se trouvent le plus souvent au mieux dans un rapport 1/100 vis-à-vis des bactéries lactiques, d'où la nécessité d'ajouter des agents sélectifs.

Plusieurs essais nous avaient montré que le sulfate de néomycine seul, à 30 mg/l ou 100 mg/l n'était pas suffisant, notamment vis-à-vis des streptocoques. Le mélange retenu, 100 mg/l de sulfate de néomycine +3 g/l de chlorure de lithium permet d'atteindre une bonne sélectivité.

Les 3 laboratoires participant aux essais ont souligné la facilité de lecture due à la taille des colonies et à l'absence de colonies parasites.

De plus, ces essais collaboratifs ainsi que nos propres contrôles ont montré que cette méthode, développée au départ pour un produit particulier, le *Bifidus* Cristallina des Laiteries réunies pouvait être utilisée pour la plupart des laits fermentés vendus en Suisse.

Nous l'avons également utilisée avec satisfaction pour la numération des bifidobactéries dans les fromages à pâte molle (dans ce cas l'acide nalidixique peut être à nouveau nécessaire si les entérobactéries sont nombreuses).

Néanmoins, il semble que ce mélange antibiotique soit peut-être trop inhibiteur, y compris vis-à-vis de quelques bifidobactéries (20 à 30%) en mauvais état physiologique.

Des essais avec des concentrations antibiotiques réduites de moitié ou même des 2/3 nous ont également donné satisfaction du point de vue de la sélectivité. Dans ces conditions, des examens microscopiques de contrôle sont réalisés sur 3 à 6 colonies par boîte suivant leur nombre et leur aspect macroscopique. Travaillant sur des produits ne contenant que 3 ou 4 espèces microbiennes connues, cette technique d'identification simple a été retenue plutôt que celle qui fait référence

(12), c'est-à-dire la mise en évidence de la Fructose – 6 – phosphate phosphokétolase (F6 PP K), jugée inapplicable en routine sur un grand nombre de colonies. Enfin, les limites de cette méthode semblent atteintes dès que l'on s'adresse à d'autres espèces de *Bifidobacterium.*

Elle ne convient pas notamment à certains yogourts vendus en France et il semble actuellement difficile de définir un milieu de culture capable d'assurer une bonne sélectivité et une bonne électivité pour toutes les souches de bifidobactéries et dans toutes les situations: laits fermentés, fromages, autres produits alimentaires. Ceci, à cause d'une part des différences de sensibilité aux antibiotiques entre les espèces de bifidobactéries, et d'autre part à l'état physiologique des bifidobactéries dans le produit, le processus de fabrication des laits fermentés influant de manière significative sur la capacité des bifidobactéries à survivre dans le yogourt puis à se multiplier dans la gélose pour dénombrement.

Dans le but d'améliorer si possible les performances de notre méthode, de nouveaux essais de sélectivité et d'électivité vis-à-vis de 8 souches de *Bifidobacterium* d'origine humaine sont en cours actuellement. En attendant qu'un ou plusieurs milieux de culture soient officiellement décrits, la méthode développée dans ce travail peut être utilisée avec une relative sécurité.

Résumé

Une méthode microbiologique de numération des bactéries du genre *Bifidobacterium* dans les laits fermentés est décrite dans ce travail.

Après une brève récapitulation des particularités de ces bactéries et de leurs exigences culturales, cet article:

- détaille les différentes étapes du développement d'un milieu de culture sélectif pour le genre *Bifidobacterium*,
- mentionne les résultats d'essais comparatifs faits dans 3 laboratoires ayant testé cette méthode en parallèle avec 2 autres milieux de culture,
- montre la disparité des résultats obtenus entre différents yogourts vendus sur le marché suisse, quant à leur contenu en bifidobactéries,
- fixe les limites de la méthode et essaie d'en tirer des enseignements qui pourraient servir lors de la description d'un (ou plusieurs) milieu(x) officiel(s) pour la numération en routine des bactéries du genre *Bifidobacterium.*

Zusammenfassung

Im vorliegenden Bericht wird eine mikrobiologische Methode für die quantitative Bestimmung von Bakterien der Gattung *Bifidobacterium* in Sauermilchprodukten beschrieben. Diese kann als routinemässiges Verfahren in Kontrollabors eingesetzt werden.

Einleitend fasst diese Arbeit die Eigenarten dieser Bakterien sowie die den Nährmedien gestellten Wachstumsbedingungen zusammen. Anschliessend werden folgende Punkte behandelt:

- Abklärung über die Entwicklung eines selektiven Nährmediums für die Bestimmung von *Bifidobacterium;*

- Auswertung der Resultate von Ringuntersuchungen, bei welchen die Methode in 3 Laboratorien jeweils mit zwei andern Nährmedien getestet wurde;
- Gehaltsunterschiede an Bifidobakterien in verschiedenen Joghurtproben aus dem Schweizer Markt;
- Grenzen der vorgeschlagenen Methoden und zu beachtende Voraussetzungen für die Festlegung eines oder mehrerer selektiver Nährmedien zum Nachweis und zur quantitativen Bestimmung von Mikroorganismen der Gattung *Bifidobacterium*.

Summary

In order to establish a reference procedure for routine analysis in a quality control laboratory, a microbiological counting technique for the genus *Bifidobacterium* in fermented milks is described.

A short overview of *Bifidobacterium* characteristics and of its culture needs is given with particular emphasis on:

- the compulsory steps and their limits to prepare a selective culture medium,
- the comparative results obtained by three independent laboratories using either this procedure or two other techniques,
- the disparity of *Bifidobacterium* content in different yogurt preparations proposed on the Swiss market.

Data obtained would hopefully permit to set a reference protocol for selective culture and enumeration of *Bifidobacterium* in dairy products.

Bibliographie

1. *Tissier, H.:* Recherche sur la flore intestinale normale chez des enfants âgés d'un à cinq ans. Ann. Inst. Pasteur **22,** 189–207 (1908).
2. *Levesque, J., Georges-Janet, L.* et *Raynaud, M.:* Recherche sur les régimes bifidogènes. Arch. franç. Pédiat. **17,** 533 (1960).
3. *Bottazzi, V.:* Activité probiotique et thérapeutique des bactéries lactiques et des bifidobactéries. Bifidobactéries et facteurs bifidigènes – Rôle en santé humaine. ARBBA – Association pour la recherche sur les bifidibactéries et les bactéries anaérobies – **9–31** Ludes (F) (1990).
4. *Finegold, S.M., Davies, A.* and *Miller, L. G.:* Comparative effect of broad spectrum antibiotics on non – spore forming anaerobes and normal bowelflora. Ann. N. Y. Acad. Sci. **145,** 268 (Eu).
5. *Dubreuil, L.:* Evaluation de la sensibilité aux antibiotiques des souches *Bifidobacterium.* Bifidobactéries et facteurs bifidigènes – Rôle en santé humaine. ARBBA – Association pour la recherche sur les bifidobactéries et les bactéries anaérobies – **9–31** Ludes (F) (1990).
6. *Beerens, H.:* Milieu électif et sélectif de culture des *Bifidobacterium.* Communication orale, International Congress, Fermented milks: Current research, 14–16 décembre 1989 Paris.
7. *Rasic, J. L.* and *Kurmann, J. A.:* Bifidobacteria and their role. 1ère ed. – Exp. Supp. Vol. **39,** p. 177, 178, Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Stuttgart 1983.
8. Même référence que (7) – 1ère ed. – Exp. Supp. Vol. **39,** p. 186, 187.

9. *Centre de collection de type microbien:* Collection nationale suisse – Catalogue ed. 1987, p. 69, Institut Universitaire de Microbiologie – CHUV Lausanne.
10. Même référence que (7) – 1ère ed. – Exp. Supp. Vol. **39,** p. 43, 50.
11. *Romond, Ch.:* Les facteurs bifidigènes : évolution de nos connaissances. Bifidobactéries et facteurs bifidigènes – Rôle en santé humaine. ARBBA – Association pour la recherche sur les bifidobactéries et les bactéries anaérobies – **9–31** Ludes (F) (1990).
12. Bergey's Manual[R] of Systematic Bacteriology **2,** 1423–1424, Williams & Wilkins, Baltimore-USA 1986.

J.-L. Chapon
Klara Kiss
Ecobion
Laboratoires de chimie et de microbiologie appliquée SA
2, Place du Cirque
CH-1204 Genève