



Recommandations pratiques pour la revivification de micro-organismes stressés en vue de leur détection et de leur numération

Programme ACTIA 96-16

Pascal GARRY (CTSCCV)

RESUME

Les traitements technologiques conduisent le plus fréquemment à une destruction incomplète des micro-organismes. Les cellules survivantes, viables mais stressées ne sont pas détectables par les techniques classiques de dénombrement. L'objectif de ce travail, réalisé dans le cadre d'un projet ACTIA, est donc de développer des méthodes analytiques en vue de la détection et de la numération des germes stressés.

Au cours de ce travail, il a été possible de définir un diluant général améliorant la revivification des 4 espèces étudiées, ainsi qu'un diluant optimal pour chacune des souches.

Par ailleurs, pour chacun des micro-organismes, il a été possible de déterminer des conditions optimales de dénombrement. Nous avons clairement démontré que le taux de recouvrement était fortement augmenté par la présence d'oxyraseTM. La validation de la méthode de revivification sur le lait et la viande hachée a donné des résultats encourageants. La méthode mise au point au cours de ce travail a entraîné un meilleur recouvrement des cellules stressées que les méthodes de référence. De ces résultats se dégagent des perspectives intéressantes pour élargir cette méthode à d'autres bactéries et d'autres stress rencontrés en industrie agro-alimentaire.

Les traitements technologiques (chaleur, froid, radiations, ...), mais également l'environnement (pH, Aw, ...) conduisent le plus fréquemment à une destruction incomplète des micro-organismes. Les cellules survivantes ont alors subi un stress. Cependant, elles sont capables de restaurer leur activité métabolique dans l'aliment et peuvent donc être à l'origine d'altérations du produit ou d'intoxications alimentaires. Ces cellules viables mais stressées nécessitent une étape de réparation cellulaire ou revivification avant de se multiplier. Pendant cette étape elles ne se multiplient pas et ne sont donc pas détectables par les techniques classiques de dénombrement.

Ainsi, les contrôles actuels sont insuffisants et le respect des critères réglementaires peut s'avérer satisfaisant alors que la population

microbienne est élevée. Il est donc important de développer des méthodes analytiques en vue de la détection et la numération des germes stressés.

L'objectif de ce travail est d'optimiser et réduire le temps nécessaire à cette revivification sans induire de multiplication cellulaire. Il devrait par ailleurs permettre d'aboutir à un consensus sur les méthodes de revivification à appliquer afin de récupérer les germes stressés présents dans un produit alimentaire. A terme, selon les résultats obtenus, une proposition de méthodologie de revivification pourrait être faite à l'AFNOR.

Cette étude est réalisée dans le cadre d'un projet ACTIA qui est mené conjointement par différents centres (ISHA, ADRIA Normandie,

ADRIA Quimper et CTSCCV). Les différents partenaires étudient en parallèle différentes bactéries (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Enterococcus faecalis*). Le laboratoire de biométrie de l'INRA de Versailles assiste les centres pour la définition des plans d'expérience et leur exploitation.

Cet article fait état des résultats obtenus au CTSCCV.

MATERIEL ET METHODE

Souche bactérienne

Deux souches d'*Enterococcus faecalis* ont été utilisées pour ce travail :

- *Enterococcus faecalis* (FS. 011) souche isolée au CTSCCV à partir de produit fini,
- *Enterococcus faecalis* (CNRZ 37.1601) souche de collection.

Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés au cours de l'étude étaient les suivants :

- Plate Count Agar (PCA), Merck, réf. 5458
- TSB-YE
- BHI, Merck, réf. 13825
- BEA
- Gélose streptocoque KF, Oxoid, réf. CM 701
- Gélose Columbia
- MD de Raybaud

Traitement thermique (stress)

Pour ce travail il était nécessaire de standardiser le stress à appliquer aux cellules, nous avons pour cela choisi le protocole présenté sur la figure 1.

Le taux de stress a été déterminé par dénombrement sur milieu sélectif (seules les cellules non stressées se multiplient) et sur milieu non

sélectif (les cellules stressées et non stressées se multiplient).

Le pourcentage de cellules stressées a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de stress} = \frac{[\text{non sélectif}] - [\text{sélectif}]}{[\text{non sélectif}]} \times 100$$

avec :

[non sélectif] : nombre de cellules se multipliant sur milieu non sélectif

[sélectif] : nombre de cellules se multipliant sur milieu sélectif

Courbes de croissance

Les courbes de croissance ont été réalisées en milieu TSB-YE et suivies par mesure de densité optique (DO) à 600 nm. Dans le cas de l'étude sur l'effet de différentes molécules sur la multiplication de cellules stressées, les courbes de croissance par densité optique ont été obtenues à l'aide d'un Bioscreen (appareil de suivi en continu de la croissance bactérienne par densité optique).

Revivification

La revivification a été effectuée dans le diluant (eau peptonnée ou peptone sel) auquel on a ajouté différentes molécules du cycle de Krebs (pyruvate, acétate, fumarate, citrate, malate, succinate, glutamate), des acides aminés (3-bétaïne, proline), des osmoprotecteurs (glycérol, Tween 20, Tween 80), des sucres (lactose, saccharose, glucose), différents ions (Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , sulfate de fer), une enzyme (catalase) et de l'extrait de levure.

Pour cela, 1 ml de la suspension bactérienne après traitement thermique (figure 1) a été prélevé et additionné à 9 ml du milieu de revivification. Les tubes ont ensuite été placés pendant 30 ou 60 minutes à 22, 30 ou 37°C.

L'effet de ces différents facteurs (molécules, temps et température) sur la revivification a été étudié à l'aide d'un plan d'expérience incomplet déterminé et exploité par A. KOBILINSKI (Laboratoire de Biométrie, INRA Versailles).

RESULTATS

Choix du milieu sélectif

3 milieux sélectifs ont été testés :

- BEA
- Gélose Columbia
- KF Streptococcus

Le milieu BEA a été retenu, nos deux souches donnant des colonies noires bien visibles après 24 h de culture.

Sur les deux autres milieux, la lecture n'était

possible qu'après 48 h d'incubation pour la gélose Columbia et 72 h pour KF Streptococcus. De plus, sur KF Streptococcus les colonies étaient très petites.

Choix du stress à appliquer

Afin de définir le stress à appliquer, nous avons réalisé deux séries d'essais : l'une à des températures sublétales (tableau 2), l'autre à des températures létales (tableau 3).

Les dénombrements ont été effectués sur milieu sélectif (BEA) et non sélectif (TSSA-YE et PCA).

Les meilleurs taux de recouvrement des cellules stressées étant obtenus avec PCA, nous ne présenterons que les résultats de % de cellules stressées obtenus après culture sur PCA et BEA. Les résultats sont présentés sur le tableau 1.

Temps	Température	% de cellules stressées	
		Souche sauvage	Souche de collection
30 min.	40°C	29%	6%
60 min.	40°C	13%	0%
30 min.	55°C	99%	99,9%
60 min.	55°C	Ds*	80%
24 min.	47,5°C	30%	25%
66 min.	47,5°C	6%	20%
45 min.	37°C	0%	0%
45 min.	58°C	80%	Ds*
45 min.	47,5°C	33%	31%
15 min.	65°C	Ds*	Ds*
30 min.	65°C	Ds*	Ds*
12 min.	60°C	Ds*	Ds*
33 min.	60°C	Ds*	Ds*
22,5 min.	53°C	67%	47%
22,5 min.	68°C	Ds*	Ds*
22,5 min.	60°C	Ds*	Ds*

Tableau 1 : % de cellules stressées après différents traitements thermiques (*Ds : destruction d'une partie de la population).

Pour la suite de l'étude nous avons donc choisi d'appliquer le stress suivant : 30 minutes à 55°C.

Effet du stress sur la croissance

Afin d'estimer l'effet du stress sélectionné sur la croissance de nos deux souches, nous avons comparé les cinétiques de croissance (suivies par mesures de densité optique à 600 nm) des cellules stressées à celles obtenues avec des cellules non stressées. Pour les courbes

témoins (cellules non stressées), nous avons réalisé l'ensemble des manipulations (passage en milieu de Raybaud, centrifugation, dilutions) à l'exception du traitement thermique. Les cellules ont ensuite été cultivées à 10 et 37°C dans un TSB-YE.

Nous constatons qu'à 37°C le stress augmente la phase de latence de 7 heures (figure 1). A 10°C, le temps de latence est augmenté de 150 heures pour la souche sauvage et de 190 heures pour la souche de collection (figure 2).

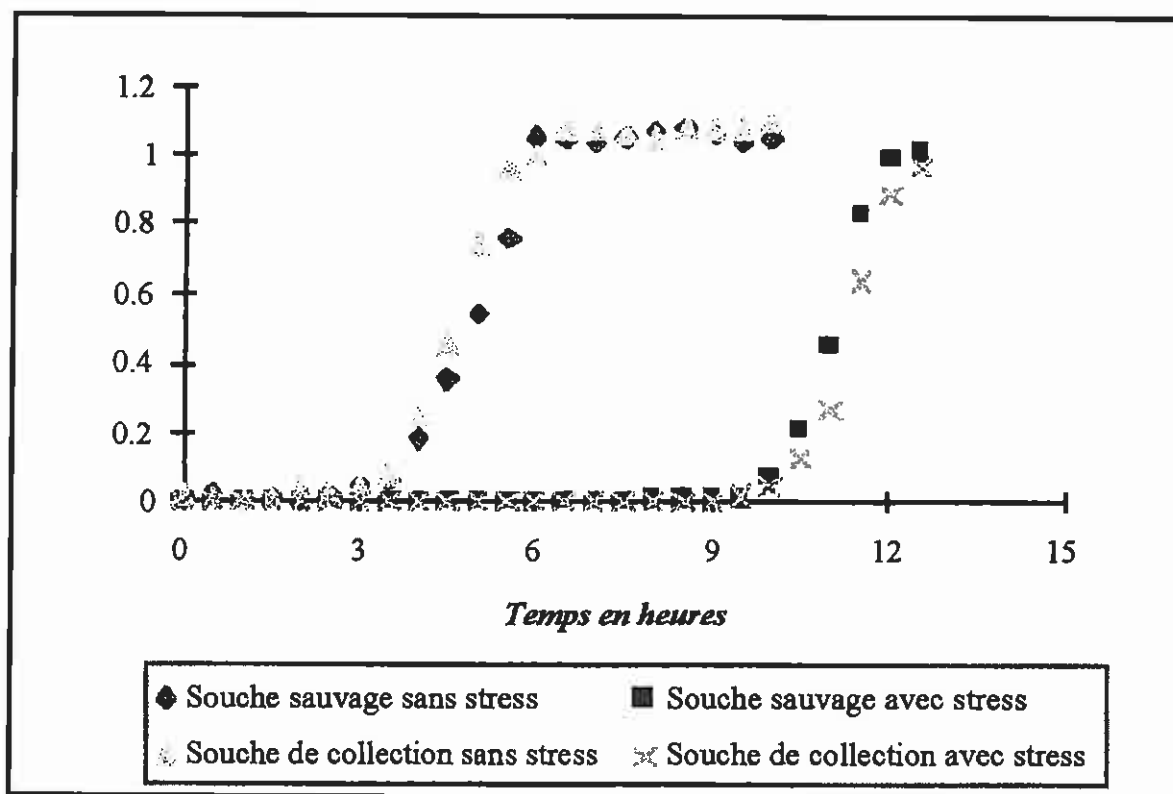


Figure 1 : Cinétique de croissance à 37°C d'*Enterococcus faecalis* avec et sans stress (30 min 55°C).

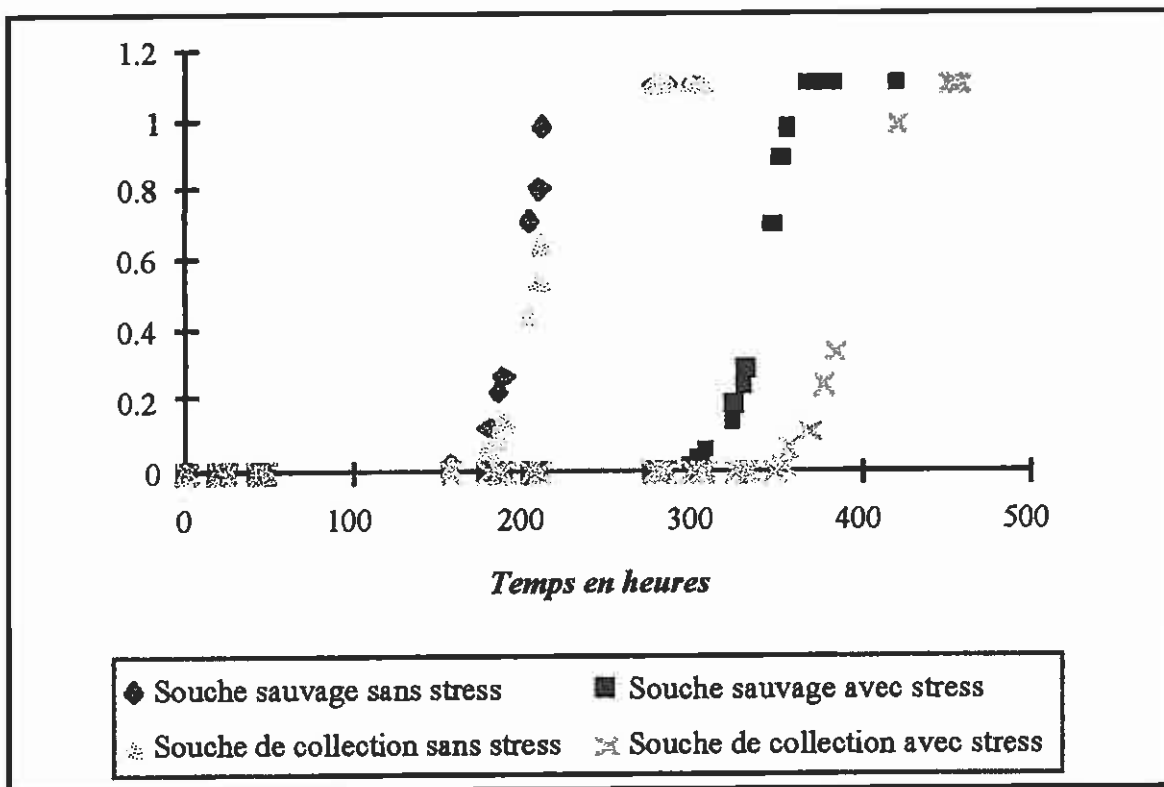


Figure 2 : Cinétique de croissance à 10°C d'*Enterococcus faecalis* avec et sans stress (30 min 55°C).

Par ailleurs, la vitesse de multiplication (μ_{max}) n'est pas modifiée par le stress.

Souche sauvage :

sans stress :

$\mu_{max.(37^{\circ}\text{C})} = 0,40$ et $\mu_{max.(10^{\circ}\text{C})} = 0,17$

après le stress :

$\mu_{max.(37^{\circ}\text{C})} = 0,45$ et $\mu_{max.(10^{\circ}\text{C})} = 0,15$

Souche de collection :

sans stress :

$\mu_{max.(37^{\circ}\text{C})} = 0,37$ et $\mu_{max.(10^{\circ}\text{C})} = 0,14$

après le stress :

$\mu_{max.(37^{\circ}\text{C})} = 0,42$ et $\mu_{max.(10^{\circ}\text{C})} = 0,18$

Survie des cellules et évolution de leur niveau de stress

De nombreux auteurs indiquent que des temps de 3 à 4 heures sont nécessaires pour obtenir

une revivification de cellules d'*Enterococcus faecalis* stressés. Avant d'appliquer de longs temps de revivification, nous avons vérifié l'absence de multiplication cellulaire à 22 et 30°C, après un stress thermique (30 minutes à 55°C). Les cellules ont été pour cela incubées à la température d'étude dans du tryptone-sel auquel nous avons ajouté l'ensemble des molécules étudiées (tableau 1). Les cellules étaient ensuite dénombrées sur milieu non sélectif (PCA) et sur milieu sélectif (BEA), ceci afin d'étudier l'état du stress au cours du temps.

Quelle que soit la température d'incubation, nous n'avons pas observé de multiplication cellulaire. Par contre, au bout de 5 heures l'ensemble des cellules semble revivifiée. A 30°C cette revivification est progressive, alors qu'à 22°C le taux de stress semble constant pendant 4h30 et les cellules sont ensuite revivifiées en 30 minutes.

Etat physiologique et niveau de stress

Afin d'étudier l'effet de l'état physiologique sur le taux de stress, nous avons appliqué le traitement thermique (30 min. à 50°C), après 4 h 30, 5 h et 5 h 30 de culture. Dans ces conditions,

les cellules étaient prélevées dans différents états physiologiques correspondant à différents points de la courbe de croissance (figure 3).

Les taux de stress obtenus dans ces différentes conditions sont présentés dans le tableau 2.

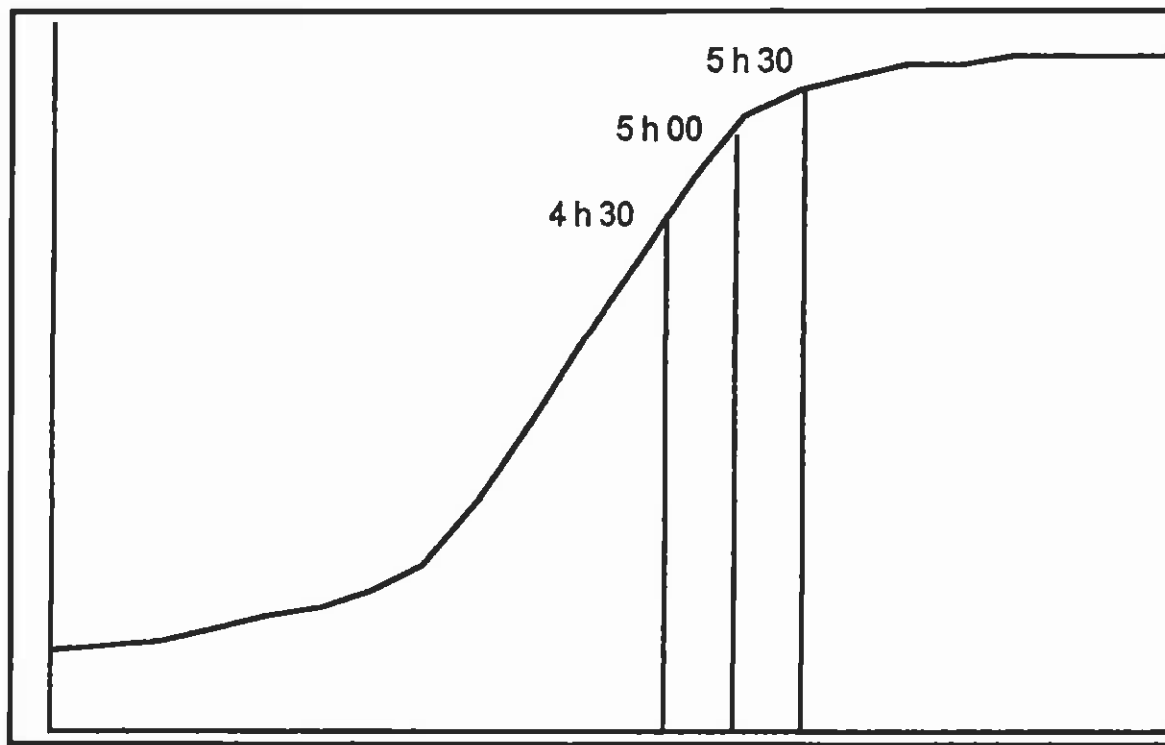


Figure 3 : Points de prélèvements à différents temps de la croissance

Temps de culture avant traitement thermique	% de stress pour la souche sauvage	% de stress pour la souche de collection
4 h 30	99,0	99,9
5 h 00	76,0	63,9
5 h 30	41,0	35,0

Tableau 2 : % de stress en fonction de l'état physiologique des cellules

L'ensemble de ces résultats montre que plus les cellules sont proches de la phase stationnaire, plus elles sont résistantes au traitement thermique et plus difficilement "stressables".

Essais de revivification

Une première série d'expériences a été menée avec l'ensemble des facteurs présentés dans le tableau 1. Seuls quelques facteurs ont un effet positif sur la revivification d'*Enterococcus faecalis* (tableau 3).

Par ailleurs, la revivification est meilleure à 30°C qu'à 37°C. Aucun résultat concluant n'a été trouvé à 22°C.

Un deuxième plan d'expérience a été effectué à partir des résultats obtenus précédemment par le CTSCCV, mais également par les autres centres participant au projet.

Le nombre de facteurs a été réduit (état physiologique, acétate, bétaine, lactose, Tween 80, catalase, Na₂HPO₄, MgSO₄). Pour cette étude, nous avons effectué une revivification de 30 minutes à 30°C. Comme dans le plan précédent, les deux diluants étaient tryptone-sel et eau peptonée tamponnée.

Facteur	Effet du facteur en log d'UFC
Pyruvate	0,16
Glucose	0,20
Lactose	0,22
Extrait de levure	0,36

Tableau 3 : Molécules ayant un effet positif sur la revivification

Deux facteurs ont une influence sur la revivification d'*Enterococcus faecalis* : l'état physiologique et la présence d'acétate. Les facteurs ayant une influence sur la revivification (lactose et extrait de levure) mis en évidence lors des premiers essais de revivifications n'ont pas été retrouvés au cours de cette série d'essais. Ceci est essentiellement dû à l'effet important de l'état physiologique qui masque totalement l'effet des autres facteurs.

Optimisation des conditions de dénombrement

Les résultats de l'ensemble des partenaires montrent qu'il sera difficile de définir un

milieu de revivification commun à plusieurs micro-organismes. Néanmoins il semble préférable, et ce quel que soit le micro-organisme, de travailler en peptone-sel plutôt qu'en eau peptonée tamponnée. Il a donc été décidé d'arrêter de travailler sur l'ajout de molécules dans le diluant. Nous allons maintenant nous intéresser à l'optimisation du dénombrement en jouant sur le milieu de dénombrement et les conditions de dénombrement. A l'aide d'un plan d'expérience incomplet, nous avons étudié différents facteurs présentés dans le tableau 4.

Facteurs	Niveau
1. Etat physiologique (temps de culture)	4h30 / 5h00
2. Diluant	Diluant optimal général Diluant optimal Eau peptonnée Eau peptonnée tamponnée
3. Catalase dans la gélose	Présence / Absence
4. Oxyrase (1ml/30ml de gélose)	Présence / Absence
5. Ensemencement	Surface / Profondeur
6. Aérobiose	Aérobiose Anaérobiose (Jarre)
7. Température d'incubation	30°C / 37°C

Tableau 4 : Les différents facteurs étudiés pour la revivification au cours du dénombrement

Les essais ont été réalisés pour les deux souches. Après avoir appliqué le protocole de stress, les cellules ont été dénombrées sur BEA

et PCA. L'ensemble des facteurs ayant un effet sont présentés dans le tableau 5.

Facteurs		Souche sauvage		Souche de collection	
Facteur	niveau	PCA	BEA	PCA	BEA
1. Oxyrase	Présence	6.453	6.420	4.404	3.984
	Absence	6.386	6.361	3.725	3.742
2. Ensemencement	Surface	6.502	6.371	4.293	4.095
	Profondeur	6.418	6.329	3.901	3.566
3. Aérobiose	Aérobiose	6.409	6.465	4.705	3.683
	Anaérobiose (Jarre)	6.393	6.354	4.406	3.060
4. Température d'incubation	30°C	6.432	6.441	3.478	4.910
	37°C	6.357	6.391	2.989	4.478

Tableau 5 : Nombre de cellules dénombrées sur PCA et BEA en fonction du niveau pris par différents facteurs ayant un effet sur la revivification

Il semble clair que, pour récupérer un maximum de cellules d'*Enterococcus faecalis* stressées, l'ensemencement doit être effectué en surface et les boîtes incubées en aérobiose à 37°C. De plus, il semble important d'ajouter de l'oxyrase afin d'améliorer la revivification des cellules stressées (intérêt démontré sur la souche sauvage).

PERSPECTIVES

Le milieu de revivification et les conditions de dénombrement définis comme optimaux vont être validés sur matrices alimentaires (lait et viande de bœuf hachée) réensemencées par des micro-organismes, puis sur des échantillons naturellement contaminés (envoyés au laboratoire pour analyse). Sur ces échantillons, la technique classique sera appliquée en parallèle de la méthode optimale.