



La congélation des produits modifie-t-elle les résultats d'analyses microbiologiques ?

2^e partie : utilisation de molécules cryoprotectrices

PASCAL GARRY

CTSCCV, 7 avenue du Général de Gaulle, 94704 Maisons-Alfort Cedex
Laboratoire de microbiologie

RÉSUMÉ

Dans le cadre de l'analyse microbiologique, le laboratoire peut être amené à congeler les produits avant analyse (report de l'analyse, conservation des échantillons dans l'attente d'une contre analyse...). L'objectif de ce travail était de regarder l'impact de la congélation sur l'analyse microbiologique. Nous avons pu montrer que la contamination microbienne des produits est sous-estimée lorsque ceux-ci sont congelés avant l'analyse (*Bulletin de liaison du CTSCCV 2002*, vol.12 n°3, p. 3-14).

Au cours de la deuxième partie de l'étude nous avons pu vérifier l'intérêt du glycérol comme cryoprotecteur. À l'inverse, nous avons pu constater que le lactose et la bêtaïne avaient un effet négatif sur *E. coli*.

INTRODUCTION

PROGRAMME ACTIA* 99-2 « EFFET DE LA CONGÉLATION ET DE LA DÉCONGÉLATION SUR DIFFÉRENTES FLORES MICROBIENNES DANS DIFFÉRENTES MATRICES ALIMENTAIRES ».

Il est actuellement préconisé de congeler les produits si leur analyse microbiologique ne peut pas être réalisée dans les 24 heures qui suivent leur réception au laboratoire ou leur prélèvement.

Cependant, de nombreuses observations expérimentales révèlent l'effet négatif des opérations de congélation et de décongélation qui induisent un état de stress, voire détruisent les micro-

organismes présents dans le produit. Les cellules survivant à la congélation ont alors subi un stress. On parlera de cellules viables non cultivables. Ces cellules ne seront donc pas détectables par les techniques classiques d'analyses. 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. Les résultats obtenus après congélation risquent d'apporter une fausse sécurité car le respect des critères réglementaires peut s'avérer satisfaisant alors que la population microbienne est élevée.

Dans le cadre de ce programme financé par l'ACTIA*, cinq centres (ADIV, CTSCCV, ISHA,

La congélation des produits modifie-t-elle les résultats d'analyses microbiologiques ?

2^e partie : utilisation de molécules cryoprotectrices

ADRIA Normandie et AGROHALL) ont étudié l'effet de la congélation et de la décongélation sur les flores naturellement présentes dans différentes matrices alimentaires ou sur des flores réintroduites dans le produit. Il s'agissait de vérifier s'il ne vaut mieux pas conserver les produits à température positive proche de 0°C plutôt que de les congeler, afin d'éviter une sous-estimation de la contamination microbienne.

Cependant dans certains cas, il n'est pas possible de s'affranchir de la congélation, comme dans le cas d'expertises où les échantillons doivent être conservés plusieurs semaines voire plusieurs mois. C'est pourquoi, dans un deuxième temps, il est envisagé de mettre en place des protocoles de congélation et décongélation minimisant le stress et la destruction de germes.

Dans le cadre de la première partie de l'étude, nous avons examiné l'impact de la congélation sur différents germes dans du jambon cuit et de la mûlée de saucisse. Ainsi, nous avons pu montrer que la contamination microbienne des produits est sous-estimée quand ceux-ci sont congelés (*Bulletin de liaison du CTSCCV* 2002, vol.12 n°3, p. 3-14).

Dans cette deuxième partie de l'étude, nous nous sommes intéressés à l'impact des molécules cryoprotectrices sur l'effet de la congélation. Cette seconde partie du programme devrait aboutir à la rédaction d'un protocole minimisant l'effet de ce mode de conservation.

ÉTUDE DE L'IMPACT DES MOLÉCULES CRYOPROTECTRICES SUR L'EFFET DE LA CONGÉLATION

PROTOCOLE

Molécules étudiées

Nous avons voulu tester l'effet de quelques cryoprotecteurs et d'une étape de préadaptation sur le stress froid.

Les cryoprotecteurs testés sont :

- un polyol : le glycérol, à 20% ;
- un sucre : le lactose à 2%, soit 2 grammes pour 100 ml de milieu (El-Kest et Marth, 1991) ;
- un osmoprotecteur : la bêtaïne, à 78 g/l ;
- un anti-oxydant : l'ascorbate de sodium à 10,7 g/l (efficace sur les bactéries lactiques) ;
- un sel qui contient un groupement amine : le glutamate de sodium à 75 g/l (efficace sur les bactéries lactiques).

Préparation des tubes et ensemencement

Nous avons testé cinq cryoprotecteurs de nature différente et à concentrations choisies, ainsi qu'une préadaptation ou non à 4°C pendant 3 heures après une descente en température à 4°C des suspensions bactériennes dans un bain glacé : cela fait 6 facteurs à 2 niveaux chacun (présence ou absence des molécules et de la phase de préadaptation), donc nous avons en tout 2⁶ soit 64 essais en plan complet. On utilise ici un plan factoriel réduit afin de diminuer le nombre d'essais réalisés (32).

Nous avons utilisé le bouillon TSB-YE comme milieu de suspension.

Les tubes sont ensemencés le jour J0 avec 0,1 ml de suspension bactérienne à 10⁵ bactéries par ml et congelés tout de suite après à -15°C, avec ou sans préadaptation de 3 heures à 4°C.

Plan d'expérience et dénombrement

Le plan d'expérience est présenté en tableau 1.

Aux jours J0, J1, J2 et J7, nous avons décongelé les tubes à température ambiante afin d'effectuer les dénombrements sur milieux non sélectifs (PCA) et sélectifs (Palcam pour *Listeria monocytogenes*, Rapid E.coli 2 pour *Escherichia coli*, et Hektoën pour *Salmonella typhimurium*) en un seul essai.

Nous avons incubé les boîtes 24 heures à température optimale de chaque milieu (37°C pour les milieux PCA, Hektoën et Palcam et 44°C pour les milieux Rapid E.coli 2).

Tube n°	Glycérol	Lactose	Bétaïne	Ascorbate de sodium	Glutamate de sodium	Pré-adaptation de 3h à 4°C
1	+	+	-	-	+	+
2	+	-	+	+	+	-
3	-	-	+	-	+	-
4	-	-	-	-	+	+
5	-	-	+	+	-	-
6	-	-	-	+	-	+
7	-	+	+	+	+	-
8	-	+	+	-	-	-
9	+	-	+	-	-	-
10	-	+	+	-	+	+
11	-	+	-	+	+	+
12	-	+	-	-	+	-
13	-	-	-	-	-	-
14	+	+	+	+	-	-
15	+	+	-	+	+	-
16	+	+	+	-	-	+
17	+	+	-	-	-	-
18	+	-	-	+	-	-
19	+	+	+	-	+	-
20	+	-	-	-	-	+
21	-	-	-	+	+	-
22	+	-	+	+	-	+
23	-	+	-	-	-	+
24	-	+	+	+	-	+
25	+	-	+	-	+	+
26	-	+	-	+	-	-
27	-	-	+	+	+	+
28	+	-	-	-	+	-
29	-	-	+	-	-	+
30	+	+	-	+	-	+
31	+	+	+	+	+	+
32	+	-	-	+	+	+

TABLEAU 1. Plan d'expérience de l'étude de l'impact des molécules cryoprotectrices sur la survie des bactéries à -15°C.

Remarque : + = présence de la molécule ou de la phase de préadaptation
 - = absence de la molécule ou de la phase de préadaptation

La congélation des produits modifie-t-elle les résultats d'analyses microbiologiques ?

2^e partie : utilisation de molécules cryoprotectrices

RÉSULTATS

Listeria monocytogenes

Les dénombrements sur milieux PCA et Palcam effectués à partir des tubes contenant du glycérol ou ayant subi la pré-adaptation au froid donnent des valeurs plus élevées que ceux des tubes sans glycérol ou sans pré-adaptation.

L'analyse statistique des résultats de ces dénombrements montre un effet significatif seulement pour le glycérol, comme l'illustre la figure 1.

Les présences ou absences des autres molécules dans les tubes n'influencent a priori pas les résultats des dénombrements de *Listeria monocytogenes*, comme le confirme l'analyse statistique.

Salmonella typhimurium

Comme pour *Listeria*, seul le glycérol montre un effet cryoprotecteur pour les bactéries (figure 2).

Escherichia coli

Pour cette bactérie, le glycérol a également un effet cryoprotecteur sensible (figure 3), mais de plus la bêtaïne et le lactose paraissent avoir un effet bactéricide, plus visible pour la bêtaïne que pour le lactose (figure 4).

Dans le cadre de ces essais, la préadaptation au froid n'a pas eu d'effet particulier et ceci pour les trois bactéries étudiées.

VALIDATION SUR MATRICE ALIMENTAIRE DE L'INTÉRÊT DU GLYCÉROL

Afin de valider l'intérêt du glycérol pour la cryoprotection, nous avons travaillé sur de la mûlée de saucisse.

PROTOCOLES

Préparation des échantillons

Pour la flore naturellement présente dans ce type de produit (Flore totale mésophile, *Pseudomonas*

et Entérobactéries), nous avons procédé à un enrichissement de 8 heures à 20°C.

Pour *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*, nous avons pratiqué un réensemencement.

Conservation des échantillons

Avant la congélation, la moitié des échantillons subit une pré-adaptation de 3 heures à 4°C.

Analyse des échantillons

À chaque point d'analyse (J0, J1, J2, J7 et J14) 3 échantillons sont analysés.

Méthodes de dénombrement

Nous avons dénombré les flores suivantes selon les normes en vigueur ou validées AFNOR :

- Flore totale mésophile à 30°C,
- *Pseudomonas*,
- Entérobactéries,
- *Salmonella* (dénombrement sur Hektoën),
- *Listeria monocytogenes*,
- *Escherichia coli* (méthode Rapid E.coli).

RÉSULTATS

Sur les 3 essais, aucune Entérobactérie ni *Pseudomonas* n'a été mis en évidence.

Les résultats obtenus pour la flore totale sont présentés sur la figure 5.

L'intérêt du glycérol pour protéger la flore totale des effets de la congélation a été confirmé sur matrice alimentaire. L'effet du glycérol est plus important à partir de J2. Par contre, la pré-adaptation ne semble pas apporter d'intérêt supplémentaire, comme déjà montré précédemment sur matrice synthétique.

Ces résultats ont par ailleurs été confirmés sur *Salmonella* (figure 6), sur *Escherichia coli* (figure 7) et à un moindre niveau sur *Listeria monocytogenes* (figure 8).

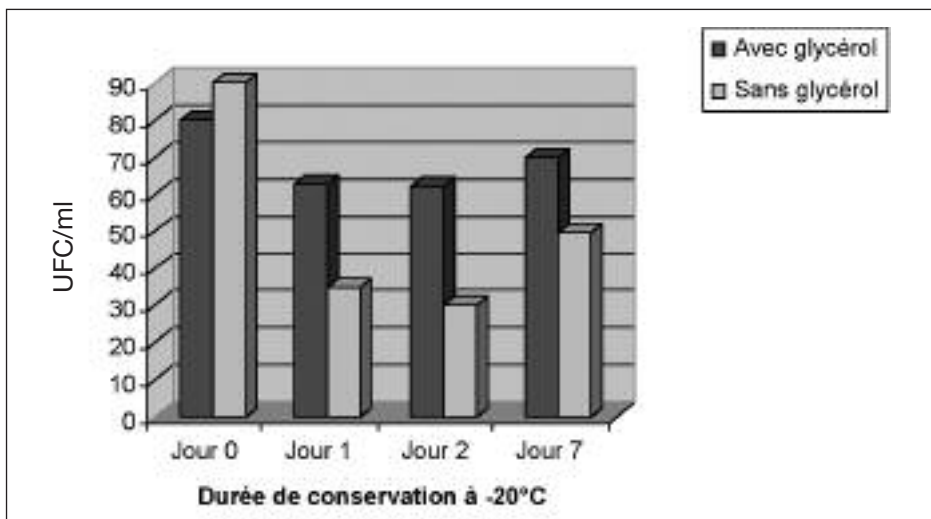


FIGURE 1.
Impact du glycérol sur la viabilité des *Listeria monocytogenes* dénombrées sur Palcam

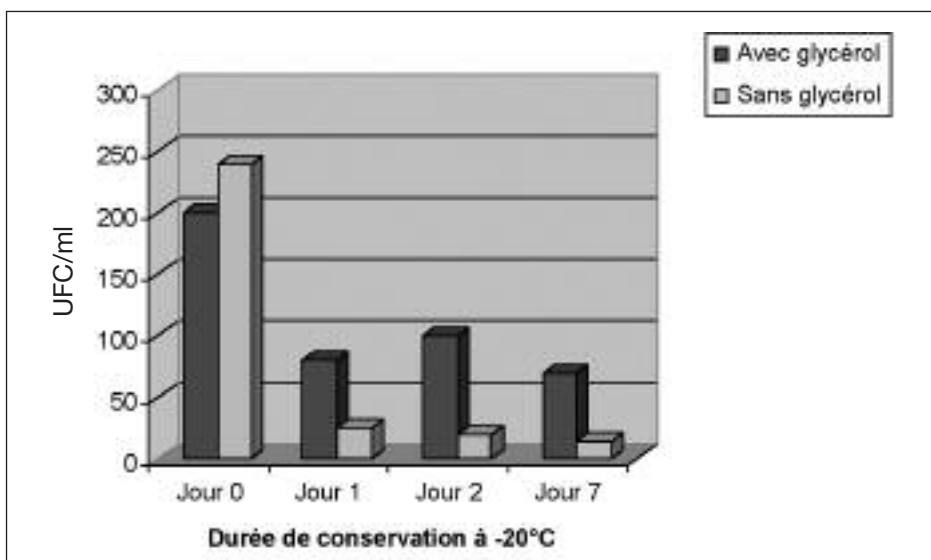


FIGURE 2.
Impact du glycérol sur la viabilité des *Salmonella typhimurium* dénombrées sur Hektoën

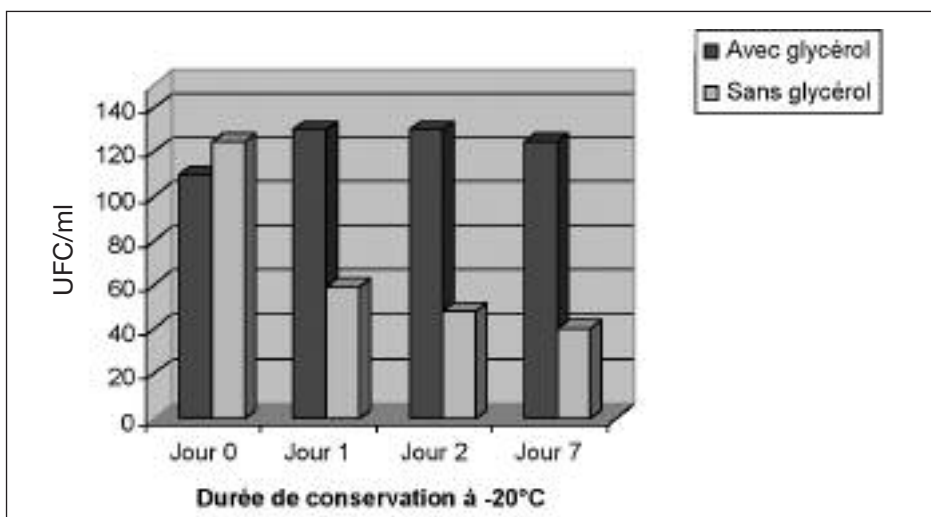


FIGURE 3.
Impact du glycérol sur la viabilité des *Escherichia coli* dénombrées sur Rapid E.coli2

La congélation des produits modifie-t-elle les résultats d'analyses microbiologiques ?

2^e partie : utilisation de molécules cryoprotectrices

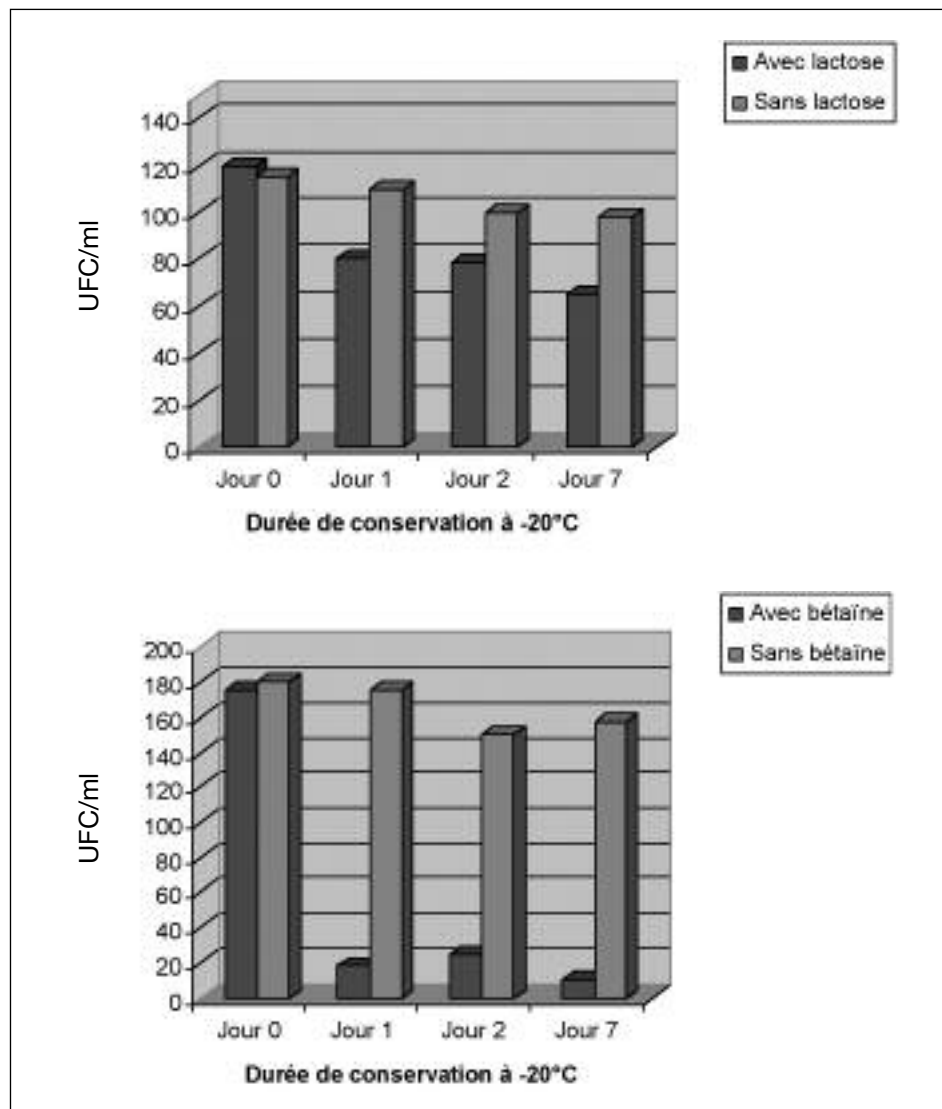


FIGURE 4.
Impact du lactose et de la bétaïne sur la viabilité des *Escherichia coli* dénombrées sur Rapid *E.coli*2

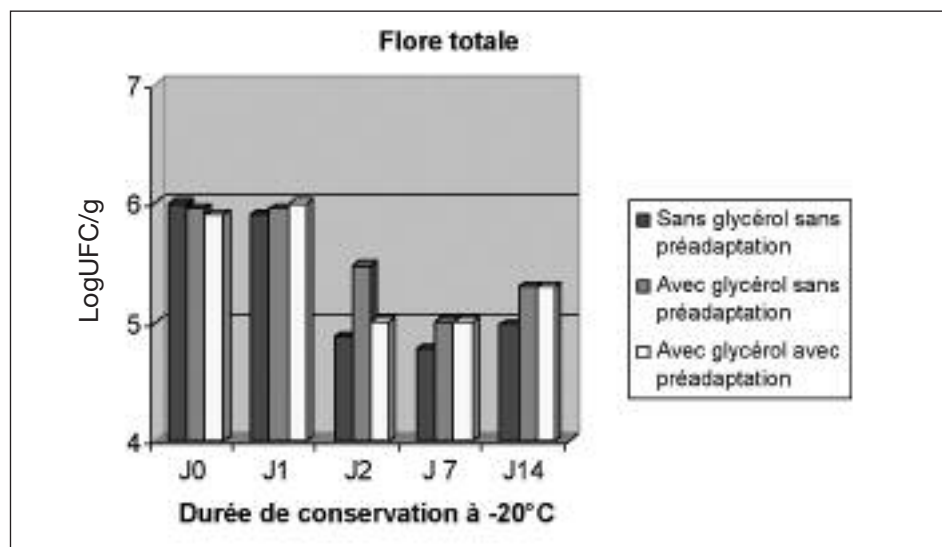


FIGURE 5.
Impact du glycérol sur la flore totale dans de la mûlée lors de la congélation.

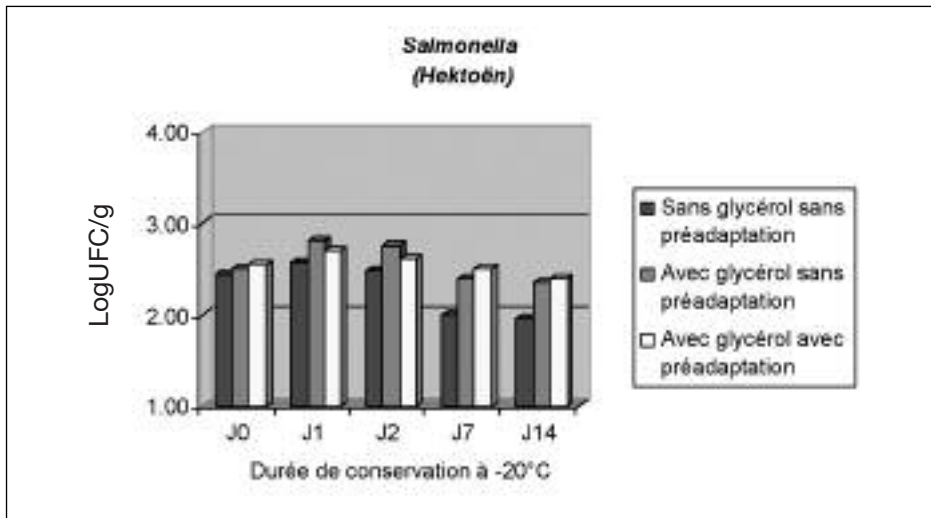


FIGURE 6. Impact du glycérol sur *Salmonella* dans de la mêlée lors de la congélation.

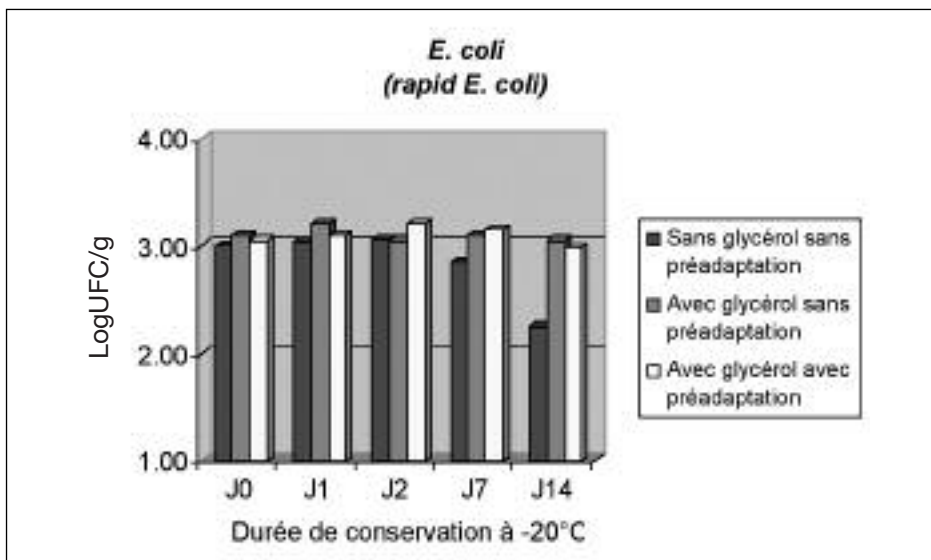


FIGURE 7. Impact du glycérol sur *E. coli* dans de la mêlée lors de la congélation.

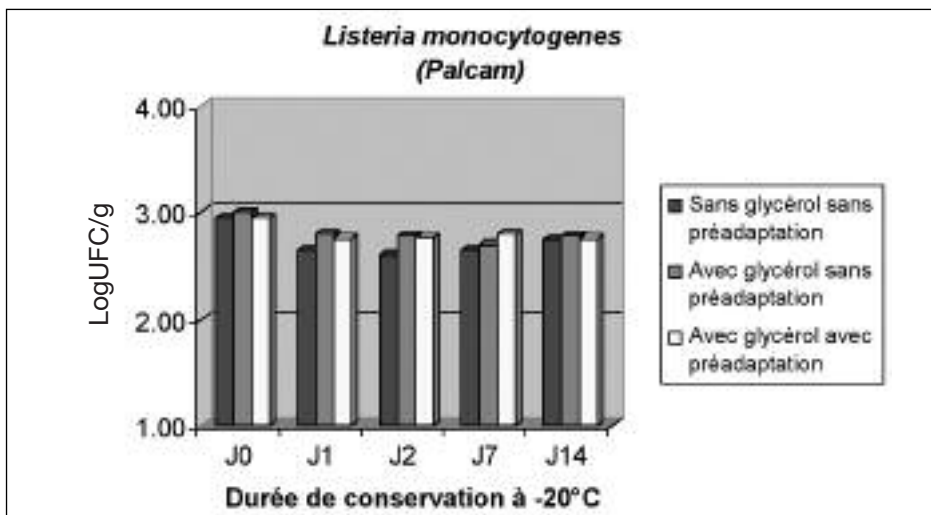


FIGURE 8. Impact du glycérol sur *Listeria monocytogenes* dans de la mêlée lors de la congélation.

La congélation des produits modifie-t-elle les résultats d'analyses microbiologiques ?

2^e partie : utilisation de molécules cryoprotectrices

CONCLUSION

Les résultats obtenus au cours de cette deuxième partie de l'étude montrent l'intérêt de l'utilisation du glycérol comme cryoprotecteur. À l'inverse, nous avons pu montrer que le lactose et la bêtaïne avaient un effet négatif sur la revivification d'*Escherichia coli* après la congélation. Par conséquent, dans le cadre du développement d'un «cryoprotecteur universel», seul le glycérol devra être retenu. Contrairement à ce qui pouvait être attendu, nous n'avons pas montré d'intérêt à effectuer une préadaptation au froid avant la congélation.

Il est à noter que dans la réalité, les échantillons ont déjà subi cette préadaptation puisque dans la majorité des cas les échantillons sont transportés à basse température.

Nous avons ensuite confirmé l'intérêt de l'utilisation du glycérol pour protéger la flore microbienne sur matrice alimentaire lors de la congélation.

CONCLUSION GÉNÉRALE DE L'ÉTUDE

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent que la sensibilité des micro-organismes au froid, et plus particulièrement à la congélation, varie en fonction de l'espèce. Ainsi, *Listeria* est insensible au froid (positif comme négatif), *Salmonella* est stressée par la congélation et *E. Coli* est stressée à 4°C (ce qui entraînera une sous-estimation de la population lors du dénombrement) et est en partie détruite à -20°C ; là encore, la contamination du produit sera sous-

estimée. Par conséquent, si l'analyse ne peut pas être effectuée dans les 24 heures suivant la réception de l'échantillon, il semble préférable de conserver le produit à basse température (0 à 2°C) plutôt que de le congeler. Ceci est d'autant plus vrai dans le cadre de contrôles de conformité d'un produit par rapport à la réglementation, et plus particulièrement lors de la recherche de germes pathogènes, dans un souci de sécurité alimentaire.

Cependant, dans certains cas on ne peut pas s'affranchir de la congélation : analyse reportée dans un plus long délai, échantillons devant être conservés pour une longue durée (expertise, échantillons en attente pour réaliser une contre-analyse...). Dans ces cas particuliers, il convient donc de mettre en place non seulement un protocole de congélation/décongélation limitant l'impact de ce mode de conservation des échantillons, mais également d'étudier l'intérêt de l'utilisation de cryoprotecteurs lors de la congélation. C'est ce qui a été étudié dans le cadre de la deuxième partie de l'étude.

Les résultats ainsi obtenus montrent l'intérêt de l'utilisation du glycérol comme cryoprotecteur. À l'inverse, nous avons pu montrer que le lactose et la bêtaïne avaient un effet négatif sur la revivification d'*Escherichia coli* après la congélation.

Enfin, l'intérêt de l'utilisation du glycérol pour protéger la flore microbienne lors de la congélation a été confirmé sur matrice alimentaire.

Par conséquent, dans le cadre du développement d'un «cryoprotecteur universel», seul le glycérol devra être retenu.