

LE DENOMBREMENT DES *PSEUDOMONAS SPP* DANS LES PRODUITS LAITIERS : DE LA DIFFICULTE DE CHOISIR UNE METHODE ADAPTEE

PARTIE 1 : BIBLIOGRAPHIE ET PRESENTATION DE L'ETUDE EXPERIMENTALE

Dans le cadre de l'harmonisation des méthodes d'analyse, l'ISO a proposé une méthode horizontale pour le dénombrement des *Pseudomonas spp* dans les produits alimentaires et destinés à l'alimentation animale (ISO/WD 13720). Or la pertinence d'une telle méthode pour le dénombrement des *Pseudomonas spp* dans les produits laitiers pose interrogation. Afin d'apporter des éléments de réponse, une étude bibliographique et technique a été réalisée. Cette étude s'organise autour d'un inventaire des méthodes de dénombrement décrites dans la littérature scientifique et des méthodes mises en place par les laboratoires interprofessionnels laitiers. Elle porte sur la description des flores *Pseudomonas* et non *Pseudomonas* les plus fréquemment dénombrées par les méthodes précitées. Enfin elle porte sur une comparaison quantitative et qualitative des valeurs de dénombrement obtenues selon 3 protocoles (dont celui proposé par la norme ISO/WD 13720) pour 60 échantillons de fromages ou spécialités fromagères.

CARTE D'IDENTITE DES *PSEUDOMONAS SPP*

Plus de 140 espèces ayant en commun un très fort pouvoir adaptatif et les caractéristiques suivantes :

Bacilles à Gram négatif de 0.5-1.0 x 1.5-5.0 μm , généralement mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. Aérobie, ils possèdent un métabolisme oxydatif mais, certains d'entre eux peuvent utiliser les nitrates comme accepteur final d'électrons en conditions anaérobies. La plupart sont incapables de se multiplier en milieu acide (pH <4.5). La plupart ne requièrent pas de facteurs de croissance organiques ; ils sont dans leur majorité chimio-organotrophes, mais certains d'entre eux peuvent être chimio-lithotrophes facultatifs et utiliser H₂ ou CO₂ comme source d'énergie. Enfin, ils peuvent être oxydase+ ou oxydase- mais toujours catalase +.

PROBLEMES ET DEFAUTS AMENES PAR LES *PSEUDOMONAS SPP*

Au sein des filières laitières, l'émergence des *Pseudomonas spp* pose un problème majeur ; elle touche l'ensemble des acteurs ; producteurs, transformateurs et affineurs et potentiellement toutes les gammes de produits, et ce, que les fabrications soient menées à partir de lait cru ou à partir de lait traité thermiquement et qu'il soit d'origine bovine, ovine ou caprine.

Ces micro-organismes qui peuvent constituer jusqu'à 60% de la flore psychrotrophe du lait cru, sont susceptibles de nuire au bon déroulement de la fabrication des produits (encrassage des matériels, caillés mous, coagulation, mauvais rendements fromagers et temps de prise modifiés) et induisent des altérations organoleptiques conduisant au déclasserement voire au rejet des produits. Ces altérations reposent sur plusieurs phénomènes :

- la production de substances mucoïdes qui induit la formation de poissage en surface des fromages et limite l'implantation des flores d'affinage, probablement par la production associée de métabolites antifongiques,

- la production d'enzymes lipolytiques et protéolytiques qui conduit à des défauts organoleptiques majeurs pour tous types de fabrication car ces enzymes présentent les caractéristiques particulières de résister aux traitements thermiques. La dégradation des caséines et lipides provoque de nombreux défauts de texture des fromages (pâte ramollie) mais également de flaveur tels que l'apparition d'amertume, de goût de rance ou de carton,

- la synthèse de métabolites de type pyrazine, au seuil de perception très faible, qui confère aux fromages contaminés des odeurs particulièrement désagréables de pomme de terre,

- la production de sidérophores (tels la pyoverdine vert fluorescent) qui conduit à des modifications des écosystèmes microbiens et à la coloration jaune à marron des fromages.

SOURCES ET VECTEURS DE CONTAMINATION PAR LES *PSEUDOMONAS SPP*

Les *Pseudomonas spp* sont considérés comme des germes ubiquitaires, ils colonisent fréquemment les eaux, les sols et plus particulièrement la rhizosphère. En concentration variable initialement dans le lait, ils peuvent ultérieurement contaminer les produits à des stades multiples de fabrication. Leurs origines les plus souvent incriminées sont le lait (via la colonisation des surfaces) l'eau (d'alimentation ou de recyclage des stations de nettoyage en place), les surfaces (ouvertes ou fermées) et l'ambiance. Au sein des matrices complexes que constituent les produits fromagers, ils sont ensuite soumis à des conditions environnementales variables et souvent subléthales telles que hautes températures, faibles concentrations en oxygène, ou faibles valeurs d'AW et pH associées à la présence de flores compétitrices.

Les candidats au dénombrement sont donc des *Pseudomonas spp* d'origines diverses souvent stressés car ayant résisté à des conditions environnementales ou des traitements physiques et/ou chimiques difficiles (agents de désinfection, traitements UV...).

QUELLE METHODE POUR LE DENOMBREMENT DES PSEUDOMONAS SPP ?

Il n'existe pas, à ce jour, de méthode normalisée pour le dénombrement des *Pseudomonas* et apparentés dans le lait et les produits laitiers. Les méthodologies utilisées apparaissent particulièrement variées comme en témoigne le tableau présenté ici et décrivant les moyens mis en place par les 25 laboratoires interprofessionnels laitiers français (résultats sur enquête téléphonique).

Protocoles cités pour le dénombrement des PSEUDOMONAS SPP

Milieu utilisé	Incubation	Fréquence analyse	Nbre de laboratoires	Tests de confirmation
CFC Biokar/Oxoid	22°C / 72h 22°C / 48h 25°C / 24 à 48h 30°C / 24 à 48 h	Rare	1 6 1 2 soit 40%	non tests norme NF oxydase oxydase, métabolisme O/F selon Kligler
Nutrient agar + pénicilline G (100 u.i.)	7°C / 10 jours 6°C / 10 jours	Rare	1 1 soit 8%	non
Milieu GSP (Merck)	22°C / 4 à 5 jours	Rare 10/mois	1 soit 4%	Psychotrophes en parallèle
PCA	4°C / 10 jours	Rare	1 soit 4%	non
Aucune analyse <i>Pseudomonas</i>			11 soit 44%	

Dans le cadre de l'harmonisation des méthodes d'analyse, l'ISO a proposé une méthode horizontale pour le dénombrement des *Pseudomonas spp* dans les produits alimentaires et destinés à l'alimentation animale (ISO/WD 13720).

L'objectif annoncé est de dénombrer tous les *Pseudomonas spp* psychrophiles, pigmentés ou non, qui jouent un rôle important dans l'altération des produits. La définition méthodologique décrite dans ce projet de norme est la suivante :

Bactéries du genre *Pseudomonas* qui forment des colonies sur gélose Cetrimide (10 µg/mL final), Fucidine (10 µg/mL final) et Cephalosporine (50 µg/mL final) agar (CFC) après incubation à 25°C (en 48 heures) et qui, de plus présentent les caractéristiques suivantes :

- réaction positive au test oxydase en 10 secondes
- absence de fermentation du glucose (en 24 heures à 37°C).

Remarque : Les tests préconisés sont menés après isolement des colonies sur gélose nutritive ordinaire et incubation 24 heures à 25°C.

La méthode proposée est similaire à celle de la norme V 04-504 préconisée pour le dénombrement des *Pseudomonas spp* dans les viandes et produits à base de viande.

LES ETUDES REALISEES

A la demande du groupe de travail mixte FIL France ALF/AFNOR, une étude préliminaire a été initiée au laboratoire de caractérisation des aliments (UR « Typicité des produits alimentaires ») afin d'évaluer la pertinence de cette méthode pour mener le dénombrement des *Pseudomonas spp* dans les produits laitiers.

Cette étude consiste en :

- Une étude bibliographique relative à « l'évaluation des méthodes de dénombrement des *Pseudomonas* et apparentés dans les produits laitiers ».
- Une étude technique visant à comparer la méthode préconisée par le projet de norme ISO WD 13720 avec d'autres méthodologies mises en place couramment dans les laboratoires d'analyse et de recherche.

1 - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Le document dresse un bilan des milieux et de leurs conditions d'utilisation pour le dénombrement des *Pseudomonas spp* ou flores souvent apparentées (flores psychrotrophes, flores lipolytiques, flores protéolytiques, flores produisant un pigment fluorescent). Il est basé sur l'analyse de quelques 135 articles scientifiques publiés entre les années 1970 et 2003 et qui sont en relation avec la problématique citée.

Le document s'articule autour de 4 thèmes :

- La description des méthodes de dénombrement des *Pseudomonas* et apparentés : composition des milieux de culture, conditions d'incubation, flores dénombrées, avantages et inconvénients.
- Les caractéristiques des flores dites connexes à savoir les flores les plus souvent dénombrées conjointement avec les *Pseudomonas* et apparentés de façon non intentionnelle.
- La description des méthodes de recherche des *Burkholderia cepacia* et *pseudomallei* (ex *Pseudomonas*).
- Quelques données relatives à la prévalence des *Pseudomonas spp* dans les laits, les produits laitiers et les altérations qu'on leur attribue.

Ce document met en évidence la diversité des approches utilisées. On rencontre le plus fréquemment des dénombrements en deux étapes, la première consistant à dénombrer des flores psychrotrophes suivie d'une différenciation des flores *Pseudomonas* et apparentés sur la base de la production de pigment ou d'activités enzymatiques (lipolyse, protéolyse..). Dans le cas de dénombrements en une étape, les milieux CFC, Cetrimide, et GSP sont ceux qui sont les plus fréquemment cités. Cependant, il faut ajouter que si les travaux relatifs au lait sont nombreux, peu d'études se sont attachées à l'analyse des fromages et produits laitiers.

2 - ETUDE TECHNIQUE

Sur la base des données recueillies au cours de l'étude bibliographique évoquée précédemment, une étude technique a été réalisée par le laboratoire de caractérisation des aliments de l'ENITA de Clermont-ferrand et sous suivi d'un groupe de pilotage du comité mixte de travail FIL/France ALF/AFNOR Microbiologie des produits laitiers. Cette étude consiste en :

- Une comparaison quantitative des dénombrements de *Pseudomonas* et apparentés obtenus selon 3 méthodologies différentes (nature du milieu, température et durée d'incubation), les conditions préconisées par le projet de norme ISO WD 13720 étant utilisées comme base de comparaison.

Les analyses ont porté sur 60 échantillons issus de 29 fromages ou spécialités fromagères choisis au stade de commercialisation et représentatifs de la diversité des technologies françaises (lait cru, thermisé ou pasteurisé, origine bovine, ovine ou caprine et, pâte molle croûte fleurie, croûte lavée ou morgée, pâte pressée cuite ou non cuite, pâte persillée, pâte fraîche)

- La description de plus de 310 isolats (provenant des dénombrements réalisés dans l'étape précédente) pour différents critères :
 - réaction au test oxydase
 - fermentation du glucose à 25°C
 - description macroscopique des colonies
 - description microscopique
 - réaction à la coloration de Gram
 - croissance à 4°C, 41°C, à 25°C sur milieux sélectifs
 - la production de pigment sur gélose King A et King B
 - la mise en évidence d'activités caséinolytique, lipolytique et estérasique

L'objectif de ces analyses étant d'évaluer la pertinence des critères de caractérisation des *Pseudomonas spp* tels que proposés dans le projet de norme ISO/WD 13720.

Les résultats de ces travaux seront présentés lors d'une prochaine publication de La lettre de CECALAIT.

**Dr F.Leriché
(ENITAC)**

SIGLES

AFNOR : Association Française de NORmalisation
 ALF : Association Laitière Française (branche nationale de la FIL)
 FIL : Fédération Internationale de Laiterie
 UR : Unité de Recherche (à l'Université)

BIBLIOGRAPHIE

- Norme AFNOR

NF V04-504 Avril 1998 - Microbiologie des aliments -
Dénombrement des *Pseudomonas spp.* dans les viandes
et produits à base de viande

- Projet de norme ISO

Erreur! Signet non défini. - Microbiologie des aliments -
Méthode horizontale pour le dénombrement de
Pseudomonas spp.

