HAL open science

Agir sur le gaspillage alimentaire

Sophie Jan, Florence Baron

To cite this version:

Sophie Jan, Florence Baron. Agir sur le gaspillage alimentaire. Revue Générale du Froid et du Conditionnement d'Air, 2016, 1159 septembre-octobre, pp.31-37. hal-01408011

HAL Id: hal-01408011

https://hal.science/hal-01408011v1

Submitted on 2 Dec 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

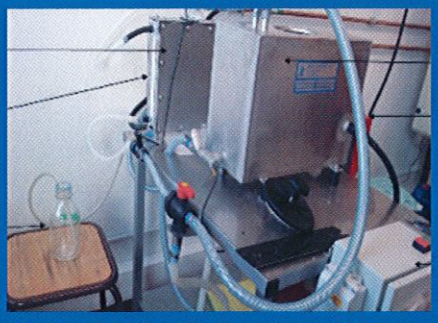
N°1159
Sept./Octobre
2016

ISSN 1958-4490 - 6 NUMÉROS/AN - 104e ANNÉE - PRIX 19€ - ÉTRANGER 25€

Revue Générale du Froid
et du conditionnement d'air

DOSSIER
Froid et alimentation

Interview de Patrick Dehaumont, directeur général de l'alimentation (DGAL), direction au ministère de l'Agriculture



Comparaison énergétique et exergétique des systèmes de dessalement

AFF Ile-de-France en visite. La centrale "tout CO_2" du Carrefour de Villeneuve-la-Garenne

REVUE GÉNÉRALE DU FROID ET DU CONDITONNEMENT D'AIR, ORGANE OFFICIEL DE L'AFF

AFF
Association Française du Froid

[3] Wulff G., Gram L., Ahrens P., Vogel B. F. 2006. One group of genetically similar Listeria monocytogenes strains frequently dominate and persist in several fish slaughter- and smokehouses. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4313–22

[4] Duret S., Guillier L., Hoang H.-M., Flick D., Laguerre O. 2014. Identification of the significant factors in food safety using global sensitivity analysis and the accept-and-reject algorithm: application to the cold chain of ham. *International Journal of Food Microbiology* 180: 39–48

[5] Carpentier B., Cerf O. 2011. Review — Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145: 1-8

[6] Dreux N., Albagnac C., Federighi M., Carlin F., Morris C.E., Nguyen-the C., 2007. Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. J. *Appl. Microbiol.*, 103, 1272-1281

[7] Zoz F., Iaconelli C., Lang E., Iddir H., Guyot S., Grandvalet C., Gervais P., Beney L. 2016. Control of Relative Air Humidity as a Potential Means to Improve Hygiene on Surfaces : A Preliminary Approach with Listeria monocytogenes. *Plos One* 11

[8] Hoang H.-M., Laguerre O., Moureh J., Flick D. 2012. Heat transfer modelling in a ventilated cavity loaded with food product: Application to a refrigerated vehicle. *Journal of Food Engineering*, 113 : 389-98

[9] Lecoq L., Flick D., Derens E., Hoang H. M., Laguerre O. 2016. Simplified heat and mass transfer modeling in a food processing plant. *Journal of Food Engineering* 171: 1-13

[10] Baranyi J., Roberts T. A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Journal of Food Microbiology* 23: 277-94

[11] Laguerre O., Flick D. 2010. Temperature prediction in domestic refrigerator: association of deterministic and stochastic approaches. *International Journal of Refrigeration* 33: 41-51

[12] Laguerre O., Hoang M. H., Flick D. 2012. Heat transfer modelling in a refrigerated display cabinet: the influence of operating conditions. *Journal of Food Engineering* 108: 353–64

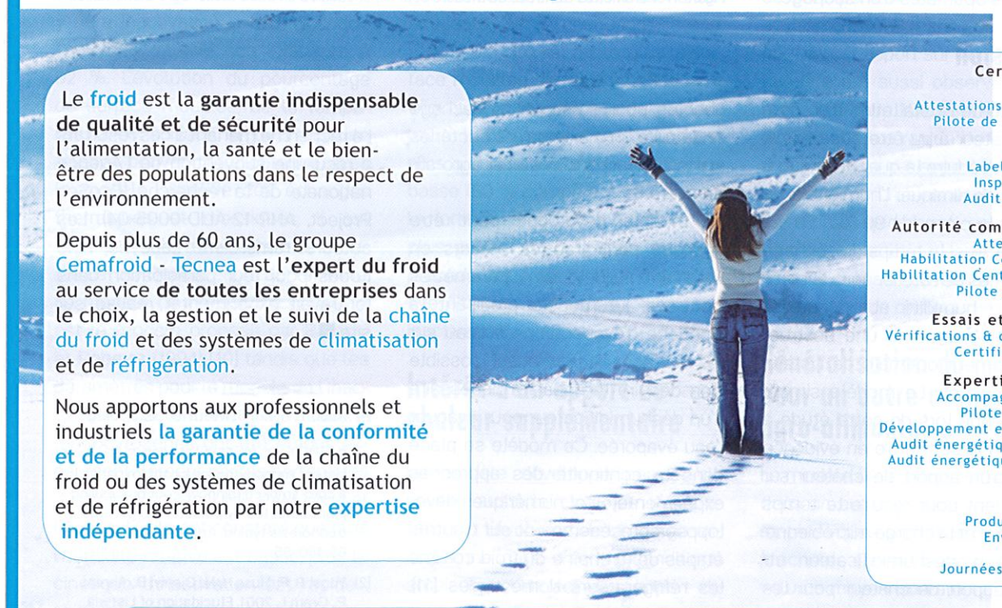
[13] Laguerre O., Duret S., Hoang M. H., Guillier L., Flick D. 2015. Simplified heat transfer modelling in a cold room filled with food products. *Journal of Food Engineering* 149: 78-86

Nomenclature

C	Concentration en vapeur d'eau de l'air $kg_{eau}.m^{-3}$
HR	Humidité relative %
k	Coefficient de transfert de masse $m.s^{-1}$
m	Masse d'eau kg
$\dot{m}$	Taux d'évaporation $kg_{eau}.s^{-1}$
S	Surface m^2
T	Température °C
V	Volume de la pièce m^3
x	Humidité absolue de l'air $kg_{eau}.kg_{airsec}^{-1}$
α	Coefficient de distribution d'air Sans dimension
β	Pourcentage de surface mouillée sur la surface totale %
γ	Coefficient de renouvellement d'air Sans dimension
ρ	Masse volumique de l'air $kg.m^{-3}$

cemafroid
L'EXPERT DU FROID

L'expert indépendant du Froid, de la Réfrigération et de la Climatisation



Le froid est la **garantie indispensable de qualité et de sécurité** pour l'alimentation, la santé et le bien-être des populations dans le respect de l'environnement.

Depuis plus de 60 ans, le groupe Cemafroid - Tecnea est l'**expert du froid** au service **de toutes les entreprises** dans le choix, la gestion et le suivi de la chaîne du froid et des systèmes de climatisation et de réfrigération.

Nous apportons aux professionnels et industriels **la garantie de la conformité et de la performance** de la chaîne du froid ou des systèmes de climatisation et de réfrigération par notre **expertise indépendante**.

Certification & ADC fluides
Attestations de capacité <
Pilote de Datafluides® <

Inspection
Labels CertiCold® <
Inspections ICPE <
Audits Certibruit® <

Autorité compétente ATP
Attestations ATP <
Habilitation Constructeurs <
Habilitation Centres de Tests <
Pilote de Datafrig® <

Essais et Etalonnage
Vérifications & qualification <
Certificats de type <

Expertise & Etudes
Accompagnement ESP <
Pilote de Dataref® <
Développement et Innovation <
Audit énergétique Industrie <
Audit énergétique Transport <

Formation
Alimentaire <
Produits de santé <
Environnement <
Métrologie <
Journées techniques <

Retrouvez toutes nos offres de services et nos offres d'emplois sur le site www.cemafroid.fr
5 avenue des Prés 94260 Fresnes - Tél. : +33 1 49 84 84 84 - contact@cemafroid.fr

tecnea GROUPE

Agir sur le gaspillage alimentaire

Par Sophie Jan et Florence Baron, Unité Pédagogique de Microbiologie, UMR STLO Agrocampus Ouest-INRA, 65 rue de Saint Brieuc, 35000 Rennes, France

Le dernier kilomètre de la chaîne du froid alimentaire, depuis l'acte d'achat jusqu'au stockage de l'aliment au domicile s'avère le maillon le plus critique. La rupture de la chaîne du froid peut entraîner une détérioration des denrées périssables et présenter un risque sanitaire et/ou financier important. Il apparaît donc essentiel de maîtriser les températures de conservation avec la même exigence à tous les maillons de la chaîne.

Résumé

On estime aujourd'hui à 25 % les pertes d'aliments post-récolte et en aval, en raison de leur altération par des microorganismes. Le contrôle de l'altération microbienne des aliments représente ainsi un des leviers essentiels permettant d'agir sur le gaspillage alimentaire et d'aller vers une organisation durable des systèmes alimentaires dans le monde. Et ce, d'autant plus que l'aval a le plus fort impact environnemental dans les filières de production [1]. L'étude menée ici illustre le risque d'altération engendré par une rupture de la chaîne du froid, en prenant comme modèle un aliment liquide pasteurisé et réfrigéré, riche en nutriments et dont la température de conservation ne doit pas dépasser 4°C. Une attention particulière est portée aux activités toxinogènes et enzymatiques de bactéries thermorésistantes adaptées au froid.

Mots clés : réfrigération, altération, toxines, thermorésistance, psychrotrophie, activités hydrolytiques.

Abstract

Post-harvest food losses due to microbial spoilage are nowadays estimated as high as 25%. The control of microbial spoilage represents one of the key levers for the reduction of global food waste and for a sustainable organization of food systems in the world, and especially since the industrial downstream processes have the highest environmental impact in various food production sectors [1]. The present paper shows the consequences of compromising cold chain integrity, using as a model a liquid pasteurized and refrigerated food, rich in nutrients, and which storage temperature should not exceed 4°C. Particular attention is paid to toxigenic and enzymatic activities of cold-adapted heat-resistant bacteria.

Keywords: food chilling, spoilage, toxins, thermotolerance, psychrotrophy, hydrolytic activities.

Introduction

L'altération des aliments

On entend par altération toute modification sensorielle, d'un point de vue olfactif, visuel ou gustatif qui rend l'aliment impropre à la consommation. L'altération est un processus complexe au cours duquel sont mis en jeu des phénomènes physiques, chimiques, biochimiques et/ou biologiques, quand des microorganismes en sont à l'origine. Les microorganismes responsables d'altérations ne constituent pas un groupe taxonomique à part entière. Il peut s'agir de bactéries, de moisissures ou de levures. La nature de la flore associée à l'altération dépend en effet de la nature et de l'origine de la microflore de l'aliment (sols, eaux, végétaux, air, poussière, nuisibles, flore du tractus intestinal pour les denrées animales, etc.), de ses propriétés intrinsèques (composition, pH, activité de l'eau (a_w), potentiel rédox, etc.) et du procédé de transformation et de stabilisation qu'a subi cet aliment (traitement thermique, acidification, séchage, addition de conservateurs, stockage au froid ou sous atmosphère modifiée, etc., ou une combinaison d'un ou de plusieurs de ces traitements). L'altération de l'aliment peut se manifester par l'apparition de colonies visibles à l'œil nu, en particulier dans le cas d'une conta-

mination par des moisissures, la production de gaz, l'apparition d'une couche gluante en surface de l'aliment, d'une pigmentation, d'une décoloration et/ou des modifications de la texture et/ou de l'odeur due au métabolisme microbien, dont la production d'enzymes hydrolytiques.

Face à cette variété d'effets, on note une grande diversité dans la nature des molécules produites dans un aliment en cours d'altération. Il peut s'agir de composés plus ou moins volatils, tels que : alcools, composés soufrés, cétones, acides organiques, pigments, amines, esters, etc. En général, les aliments affectés par l'altération microbienne ont pour caractéristiques d'offrir aux microorganismes les conditions optimales pour leur croissance, et particulièrement en raison de leur richesse en éléments nutritifs (sources d'azote et de carbone en premier lieu), de leur teneur en eau libre et de la neutralité de leur pH. Les aliments concernés peuvent être d'origine variée, mais il s'agit principalement de produits frais riches en protéines (viandes, poissons, produits laitiers), de légumes et de fruits. Ces derniers sont plutôt concernés par l'altération par des levures et des moisissures, la croissance bactérienne y étant plus ou moins contrôlée par leur faible pH.

Le contrôle des phénomènes d'altération passe par la recherche précoce (i) des microorganismes mis en jeu (méthodes microbiologiques ou moléculaires), (ii) d'indicateurs de la présence de ces microorganismes (méthodes chimiques, physiques ou physico-chimiques) et/ou par des évaluations sensorielles (modifications de la couleur, de la texture, de l'odeur, de la saveur, et/ou de l'aspect général). Ces mêmes critères peuvent être utilisés pour prédire la durée de vie de l'aliment ou pour en apprécier la qualité. La recherche du ou des microorganismes est laborieuse et coûteuse et ne donne pas d'informations sur la capacité de la ou des souche(s) incriminée(s) à exprimer des propriétés altérantes. Il nous semble aujourd'hui plus pertinent, surtout en ce qui concerne le risque d'altération, non pas de cibler la flore elle-même mais plutôt les activités altérantes qui peuvent, d'ailleurs, être le résultat de l'expression d'une flore mixte, potentiellement composée d'un mélange d'espèces.

Nous avons donc souhaité investiguer le champ des expressions enzymatiques dans l'environnement du froid industriel pour envisager leur application à des contrôles pertinents dans les secteurs industriels concernés par des problèmes d'altération, mettant principalement en jeu une flore potentiellement psychrotrophe.

Les bactéries thermorésistantes adaptées au froid

Si l'on écarte les problèmes de contamination post-pasteurisation, les aliments liquides pasteurisés et réfrigérés peuvent aussi véhiculer des bactéries ayant résisté au traitement thermique en raison de leur capacité à sporuler. Lors du stockage à faible température, la germination des spores peut être suivie d'une croissance de la population bactérienne, y compris à faible température quand des souches psychrotrophes sont mises en jeu. Ces bactéries peuvent ainsi être à l'origine d'altérations. Le terme « psychrotrophe » se réfère aux microorganismes mésophiles, c'est-à-dire dont l'optimum de croissance se situe entre 25 °C et 35 °C, mais qui sont aussi capables de se développer à des températures inférieures ou égales à 7 °C. Les microorganismes psychrotrophes ne constituent donc pas un groupe taxonomique spécifique. Au contraire, ils peuvent être à coloration de Gram négative ou positive, avoir une morphologie variée, de type coque ou bacille, une capacité ou non à sporuler et de types respiratoires distincts. Il peut aussi s'agir de levures ou de moisissures. Nous focaliserons cet article sur un modèle d'étude bien référencé : le groupe *Bacillus cereus*, nommé aussi *B. cereus* sensu lato (voir encadré), dont certaines souches peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires et/ou d'altérations, y compris quand l'aliment est stocké à faible température.

En raison de la psychrotrophie de nombreuses souches, le groupe *B. cereus sensu lato* est un modèle de choix pour l'étude des mécanismes d'adaptation au froid et offre un large champ d'investigation. L'implantation de ces bactéries dans l'environnement industriel nécessite en effet l'activité coordonnée de nombreux gènes dont l'identité et les modes d'action restent aujourd'hui encore mal connus [19].

L'œuf, un modèle de substrat adapté à l'étude des altérations microbiennes des produits liquides pasteurisés et réfrigérés

La richesse de l'œuf en lipides et en protéines en fait un milieu tout à

Les bactéries du groupe *B.cereus*

Les bactéries du groupe *B. cereus* sont des bacilles sporulés ubiquitaires, aéro-anaérobies facultatifs, à coloration de Gram positive. Elles présentent des spores ovales non déformantes en position terminale à sub-terminale.

Le groupe rassemble six « espèces » : *Bacillus anthracis, Bacillus cereus sensu stricto, Bacillus mycoides, Bacillus pseudomycoides, Bacillus thuringiensis et Bacillus weihenstephanensis.* Cette classification est basée, non pas sur des critères génétiques, mais plutôt sur des considérations pratiques subjectives telles que la virulence, à l'image des « espèces » *B. anthracis, B. cereus sensu stricto et B. thuringiensis*, la physiologie, à l'image de l'« espèce » *B. weihenstephanensis*, capable de se développer à des températures inférieures à 7°C et incapable de se développer à des températures supérieures ou égales à 43°C, et la morphologie, à l'image des « espèces » *B. mycoides et B. pseudomycoides*, qui présentent des colonies d'aspect rhizoïde sur milieu de culture gélosé. Dans le groupe, l'« espèce » *B. anthracis* est l'agent causal de l'anthrax et l'« espèce » *B. thuringiensis* produit un cristal entomo-pathogène qui peut être utilisé comme bio-pesticide [2].

L'« espèce » *B. cereus sensu stricto* est connue pour provoquer des TIAC, en raison de la production de deux types de toxines, (i) le céréulide ou toxine émétique, préformée dans l'aliment avant ingestion, à l'origine du syndrome émétique [3] ; (ii) plusieurs autres toxines, l'hémolysine BL, l'entérotoxine non hémolytique et les cytotoxines K, responsables du syndrome diarrhéique [4]. Les bactéries du groupe produisent également de nombreux facteurs de virulence, tels que des hémolysines, des phospholipases, des protéases et des collagénases qui jouent un rôle dans l'infection [5], [6] et peuvent être à l'origine de cas graves de septicémies et d'infections diverses [7]. Pour conclure, toutes les souches du groupe sont susceptibles de posséder au moins un gène codant pour un facteur de virulence. Des protéases, des phospholipases et des lipases peuvent aussi être à l'origine de l'altération des aliments [8] - [17]. Même si l'usage du nom de l'espèce a encore cours, pour des critères phénotypiques et surtout de virulence, et l'« espèce » *B. anthracis* en est un bon exemple, une nouvelle classification en sept groupes phylogénétiques fait aujourd'hui référence, pouvant rassembler, dans un même groupe, des souches appartenant à des espèces différentes mais partageant le même domaine de température de croissance. Cette structuration en groupes phylogénétiques associés à un domaine de température de croissance indique que l'adaptation des bactéries du groupe *B. cereus* au froid est un phénomène important dans leur évolution [18].

Le jaune d'œuf

Le jaune d'œuf est utilisé dans les méthodes standard d'isolement et de dénombrement des bactéries du groupe *B. cereus* (milieux PEMBA, MYP et Mossel) et pour la mise en évidence de l'activité phosphatidylcholine phospholipase C (PC-PLC), plus communément appelée lécithinase ([20] - [22]. Cette enzyme, codée par le gène *plcB* (ou cerA), hydrolyse la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylsérine [20] - [22]. Dans une émulsion de jaune d'œuf, elle produit un blanchiment et forme une couche lipidique en surface [23]. Sur une gélose contenant de 5 à 5,5 % de jaune d'œuf, les colonies produisant de la lécithinase développent un halo opaque [24].

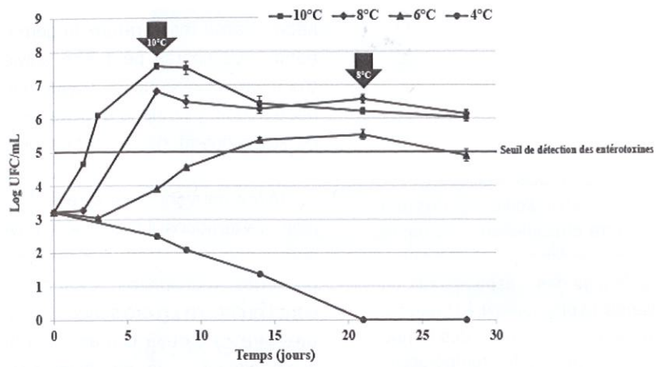


Figure 1. Evolution de la population microbienne au cours du temps à différentes températures d'incubation dans une émulsion d'œuf stérile. Le seuil de détection des entérotoxines est indiqué par une barre et les flèches noires indiquent les temps à partir desquels une altération stable de l'œuf est observée à 10°C et 8°C.

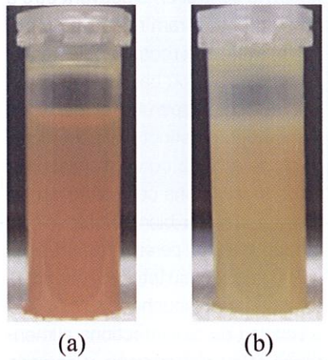


Figure 2. Aspect de l'œuf non inoculé (a) et aspect stabilisé de son altération en raison du développement microbien : maintien d'une seule phase blanchie et compacte (b).

La croissance microbienne est contrôlée par une maîtrise stricte des températures de stockage

Dispositif expérimental

Une souche de la collection -« espèce » *B. weihenstephanensis*- a été inoculée à une concentration de 3 Log UFC/mL dans de l'œuf entier homogénéisé après cassage stérile. Les milieux inoculés ont été répartis dans des tubes stériles de 10 ml et incubés à 4, 6, 8 ou 10 °C pendant 28 jours. La population microbienne a été dénombrée après inoculation du prélèvement dans la masse d'un milieu gélosé riche et incubation pendant 24 h à 30 °C. Les essais ont été réalisés en triplicat. Les résultats sont présentés en Log Unité formant colonie (UFC)/mL.

Résultats

La figure 1 montre que le taux de croissance de la souche est affecté par la température : plus la température est faible, plus la croissance est lente. La phase stationnaire est atteinte en une semaine à 8 et 10°C, contre moins d'un jour à 30°C (résultats non présentés). En effet, rappelons qu'une souche psychrotrophe présente une température optimale de croissance proche de celle des souches mésophiles. Au-delà de 7 jours à 8 et 10°C, la population décroît progressivement, mais on note encore un niveau d'environ 6 Log UFC/mL après 21 jours d'incubation. A 6°C, le taux de croissance est plus faible qu'aux températures de 10 et de 8°C et la phase stationnaire est atteinte pour un niveau de population plus faible (5 Log UFC/mL en moyenne). A la température la plus faible testée, correspondant à la température de stockage des aliments liquides pasteurisés (4°C), la population décroît jusqu'à devenir indétectable au-delà de 21 jours d'incubation. Les cellules ne sont pas revivifiables, c'est-à-dire que leur transfert en conditions optimales (milieu neuf et incubation à 30°C) montre qu'elles restent indétectables.

La croissance de la population s'accompagne d'une modification progressive de l'aspect de l'œuf : on note l'apparition d'une phase distincte, blanchie, qui finit par envahir tout le milieu (Figure 2). En effet, l'œuf altéré ne forme plus qu'une seule phase blanchie et compacte, stable au cours du temps. Alors que cet aspect est observé dès 7 jours d'incubation à 10°C, il ne l'est qu'après 21 jours à 8°C. Après 28 jours d'incubation, on ne note pas d'altération à 6°C. Après 2 mois d'incubation à 4°C, l'aspect de l'œuf reste aussi inchangé.

Ces résultats montrent clairement qu'une rupture de la chaîne du froid pourrait permettre à la bactérie de se multiplier. Il apparait donc essentiel de maintenir une température inférieure à 6°C pour contrôler la croissance de la population. On peut noter que les températures mises en œuvre dans les laboratoires d'analyse pour la détection ou le dénombrement des microorganismes sont souvent proches de 30°C et ne permettent pas d'évaluer l'effet d'un faible écart de température sur la croissance microbienne aux températures de stockage réfrigéré. Aux températures les plus élevées (10 et 8°C), la croissance de la population s'accompagne d'altérations visibles à l'œil nu, le seuil d'apparition d'une altération stable correspondant à une concentration bactérienne comprise entre 6 et 7 Log UFC/mL.

>>> fait favorable à l'expression d'activités enzymatiques bactériennes (voir encadré page précédente).

Nous avons étudié le comportement de souches psychrotrophes du groupe, appartenant à l'« espèce » *B. eihenstephanensis* et isolées d'aliments liquides pasteurisés et stockés à faible température, dans des milieux de culture liquides et gélosés à base d'œuf entier. L'étude de l'effet de la température a ainsi pu mettre en évidence l'importance du contrôle strict de la chaîne du froid, qu'il s'agisse du risque sanitaire ou du risque d'altération de l'aliment.

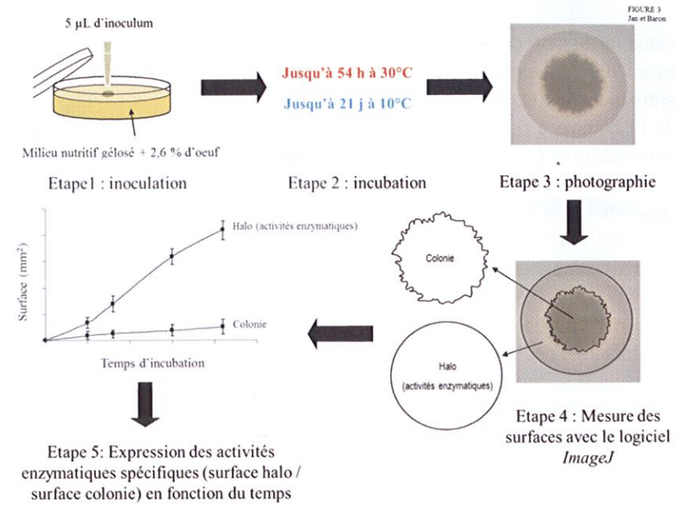


Figure 3. Principales étapes du protocole de quantification de l'activité hydrolytique bactérienne.

Encadré n°3

1. TECRA (*Bacillus cereus* Diarrheal Enterotoxin Visual Immuno Assay (TECRA-BDE, TECRA, Roseville New South Wales, Australie)
2. Oxoid (*Bacillus cereus* Enterotoxin reverse Passive Latex Agglutination test ; BCET-RPLA, Unipath, Basingstoke, Royaume Uni).

Le kit TECRA permet de détecter la production de l'entérotoxine non hémolytique et le kit Oxoid, celle de l'hémolysine BL, ces deux toxines produites par le groupe *B. cereus* pouvant être à l'origine d'un syndrome diarrhéique.

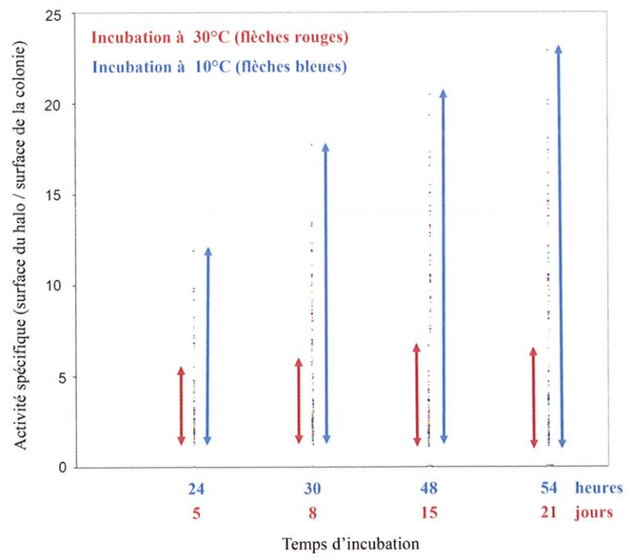


Figure 4. Caractérisation cinétique de l'activité des enzymes bactériennes à 30°C (en rouge) et à 10°C (en bleu) dans un milieu gélosé à base d'œuf. Chaque point représente la moyenne de trois replicats pour chaque isolat d'une collection de bactéries psychrotrophes du groupe *B. cereus*. Les flèches indiquent l'intervalle de variation au sein de la collection pour chaque temps et chaque condition de température.

L'activité toxinogène est maîtrisée par le contrôle de la population microbienne

Dispositif expérimental

Les conditions d'incubation ont été répétées telles que décrites dans le paragraphe 1.1 Parallèlement au suivi de la croissance, l'activité toxinogène a été évaluée à l'aide de kits immunochimiques commerciaux (voir encadré 3).

Résultats

A 4°C, les enterotoxines sont indétectables. A 6°C, les deux kits révèlent la présence d'entérotoxines après 21 jours d'incubation, alors que la population microbienne atteint environ 5 Log UFC/mL. A 8 et 10°C, les enterotoxines sont détectées à partir de 7 jours d'incubation, correspondant à une population d'environ 5 et 7 Log UFC/mL, respectivement. Après 28 jours d'incubation à 8 et 10°C, la coagulation totale de l'ovoproduit rend le résultat des dosages par les kits difficile à interpréter.

On peut donc conclure que les entérotoxines peuvent être produites directement dans l'aliment, et qu'elles sont détectables à partir d'un seuil de population qui se trouve aux alentours de 5 Log UFC/mL (Figure 1). Encore une fois, ces résultats montrent que le maintien strict d'une température de 4°C permet de contrôler le risque sanitaire, aucune entérotoxine n'étant détectée à cette température, quel que soit le temps d'incubation. On peut souligner le fait que >>>

l'absence d'altération de l'œuf ne signifie pas qu'il est sain. En effet, pour une population proche de 5 Log UFC/mL, atteinte après une dizaine de jours à 6°C, on note la production d'entérotoxines alors que l'aspect de l'œuf est inchangé (Figure 1).

Les activités hydrolytiques mesurées aux températures optimales de croissance ne sont pas le reflet des altérations observées au froid

Dispositif expérimental

Les activités hydrolytiques bactériennes ont été mesurées sur un milieu gélosé à base d'œuf (milieu nutritif riche gélosé additionné de 2,6 % d'une émulsion stérile d'œuf) selon le schéma expérimental représenté sur la figure 3 (page précédente). Soixante-huit souches psychrotrophes du groupe *B. cereus*, issues d'un environnement industriel, ont été incubées à température optimale (30°C) et à température de réfrigération (10°C). Les colonies se sont développées, entourées de halos attestant de leurs activités hydrolytiques. La mesure du rapport entre la surface du halo et la surface de la colonie a permis de calculer une activité enzymatique spécifique pour chaque souche et chaque température. Cette méthode permet de quantifier une activité enzymatique contrairement aux résultats binaires qui sont habituellement obtenus avec ce type de protocole expérimental (présence/absence de halo).

Résultats

Les résultats présentés sur la figure 4 (page précédente) montrent la cinétique de l'expression des activités enzymatiques spécifiques totales, incluant les activités protéasiques, lipasiques et phospholipasiques que le milieu riche à base d'œuf permet de mettre en évidence. L'expression d'activités enzymatiques bactérienne peut ainsi être directement évaluée dans l'aliment lui-même.

La collection bactérienne testée montre une forte diversité quant à son niveau d'expression d'enzymes hydrolytiques, et particulièrement à 10°C. Certains isolats n'expriment aucune activité hydrolytique sur le milieu gélosé à base d'œuf sélectionné (absence de halo).

Les activités spécifiques sont plus fortes à 10°C qu'à 30°C et peuvent continuer à évoluer au-delà de 21 jours d'incubation à faible température, alors qu'elles atteignent une valeur maximale dès les premiers temps d'incubation à 30°C.

On peut donc conclure de ces travaux que l'évaluation du potentiel d'altération de souches psychrotrophes mérite d'être réalisée aux températures de réfrigération. En effet, les activités enzymatiques bactériennes exprimées aux températures optimales de croissance ne sont pas le reflet de ce qu'elles sont au froid quand des souches psychrotrophes sont mises en jeu. Il a déjà été montré qu'effectivement, la flore psychrotrophe fait preuve d'une efficacité catalytique bien supérieure à celle de la flore mésophile [25] - [27], ce qui n'est pas sans poser de problème lors de la conservation des aliments pasteurisés réfrigérés. D'après Ray (2006) [28], la régulation de l'expression des protéines impliquées dans la phase d'adaptation au froid semble aussi beaucoup plus fine chez les bactéries psychrotrophes.

Conclusion

L'ensemble des travaux présentés dans cet article permet de conclure à l'importance du maintien d'une température stable et n'excédant pas 4°C pour assurer la qualité sanitaire d'aliments liquides pasteurisés riches en substrats nutritifs. En effet, une rupture de la chaîne du froid peut avoir des conséquences néfastes d'un point de vue économique et/ou sanitaire quand des souches psychrotrophes ayant résisté aux barèmes de pasteurisation sont présentes dans l'aliment.

Leur psychrotrophie se manifeste non seulement pas leur capacité à croître à faible température mais aussi à exprimer des activités altérantes spécifiques au froid, voire des activités toxinogènes dès lors que la population a pu se développer au-delà d'un seuil critique.

D'un point de vue fondamental, ces travaux ont pour perspectives d'étudier le lien potentiel entre l'expression de marqueurs spécifiques d'adaptation au froid et l'expression d'activités enzymatiques potentiellement altérantes et/ou pathogènes. D'un point de vue plus appliqué, ils permettent de mettre en évidence l'importance d'analyser le comportement de bactéries *in situ*, c'est-à-dire directement dans l'aliment, et de mettre au point des tests microbiologiques reflétant au mieux ses conditions de stockage, y compris l'éventualité d'une rupture de la chaîne du froid chez le consommateur. La recherche de marqueurs précoces d'altération, en lien avec l'expression d'activités hydrolytiques, pourrait permettre la mise au point d'outils de diagnostic et d'orientation des aliments vers divers types de commercialisations, liés à leurs conditions d'utilisation et de conservation. L'ensemble de ces travaux participe à une meilleure maîtrise des pertes, et ainsi à une organisation plus durable des systèmes alimentaires dans le monde ■

Bibliographie

[1] Esnouf, C. et Bricas, N., « De nouveaux enjeux pour les systèmes alimentaires », In : DuALIne - durabilité de l'alimentation face à de nouveaux enjeux. Questions à la recherche, Esnouf, C., Russel, M., Bricas, N. (Eds), Paris, INRA, p. 9-26, 2011.

[2] Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. et Dean, D.H., « *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins », Microbiology and Molecular Biology Reviews, vol. 62, p. 775-806, 1998.

[3] Agata, N., Mori, M., Ohta, M., Suwan, S., Ohtani, I. et Isobe, M., « A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells », Fems Microbiology Letters, vol. 121, p. 31-34, 1994.

[4] Lund, T. et Granum, P.E., « Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus* », Microbiology-Uk, vol. 143, p. 3329-3336, 1997.

[5] Michelet, N. et Mahillon, J., « *Bacillus cereus*, opportuniste et pathogène », Bulletin de la Société Française de Microbiologie, vol. 18, p. 113-122, 2003.

[6] Schoeni, J.L. et Wong, A.C.L., « *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins », Journal of Food Protection, vol. 68, p 636-648, 2005.

[7] Turnbull, P.C.B. et Kramer, J.M, « Non-gastrointestinal *Bacillus cereus* infections: an analysis of exotoxin production by strains isolated over a two-year period », Journal of Clinical Pathology, vol. 36, p. 1091-1096, 1983.

[8] Priest, F.G., « Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus* », Bacteriological Reviews, vol. 41, p. 711-753, 1977.

[9] Yan, L., Langlois, B.E., Oleary, J. et Hicks, C.L., « Purification and characterization of four extracellular proteases isolated from raw milk psychrotrophs », Journal of Dairy Science, vol. 68, p. 1323-1336, 1985.

[10] Kalogridouvassiliadou, D., « Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk », Journal of Dairy Science, vol. 75, p. 2681-2686, 1992.

[11] Maciver, B., McHale, R.H., Saul, D.J. et Berggquist, P.L., « Cloning and sequencing of a serine proteinase gene from a thermophilic Bacillus species and its expression in *Escherichia coli* », Applied and Environmental Microbiology, vol. 60, p. 3981-3988, 1994.

[12] Pirttijarvi, T.S.M., Graeffe, T.H. et Salkinojasalonen, M.S., « Bacterial contaminants in liquid packaging boards: Assessment of potential for food spoilage », Journal of Applied Bacteriology, vol. 81, p. 445-458, 1996.

[13] Lindsay, D., Brozel, V.S., Mostert, J.F. et von Holy, A., « Physiology of dairy-associated *Bacillus* spp. over a wide pH range », International Journal of Food Microbiology, vol. 54, p. 49-62, 2000.

[14] Bach, H.J., Errampalli, D., Leung, K.T., Lee, H., Hartmann, A., Trevors, J.T. et Munch, J.C., « Specific detection of the gene for the extracellular neutral protease of *Bacillus cereus* by PCR and blot hybridization », Applied and Environmental Microbiology, vol. 65, p. 3226-3228, 1999.

[15] Bach, H.J., Hartmann, A., Schloter, M. et Munch, J.C., « PCR primers and functional probes for amplification and detection of bacterial genes for extracellular peptidases in single strains and in soil », Journal of Microbiological Methods, vol. 44, p. 173-182, 2001.

[16] Grass, G., Schierhorn, A., Sorkau, E., Muller, H., Rucknagel, P., Nies, D.H. et Fricke, B., « Camelysin is a novel surface metalloproteinase from *Bacillus cereus* », Infection and Immunity, vol. 72, p. 219-228, 2004.

[17] Chen, L., Coolbear, T. et Daniel, R.M., « Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp isolated from milk powder production lines », International Dairy Journal, vol. 14, p. 495-504, 2004.

[18] Guinebretière, M.H., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-Thé, C., Heyndrickx, M. et De Vos P., « Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group », Environmental Microbiology, vol. 10, p. 851-865, 2008.

[19] Brillard, J., Jéhanno, I., Dargaignaratz, C., Barbosa, I., Ginies, C., Carlin, F., Fedhila, S., Nguyen-the, C., Broussolle, V. et Sanchis, V., « Identification of *Bacillus cereus* genes specifically expressed during growth at low temperatures », Applied and Environmental Microbiology, vol. 76, no 8, p. 2562-2573, 2010.

[20] Kushner, D.J., « An evaluation of the egg-yolk reaction as a test for lecithinase activity », Journal of Bacteriology, vol. 73, no 3, p. 297–302, 1957.

[21] Hergenrother, P.J., Spaller, M.R., Haas, M.K. et Martin, S.F., « Chromogenic assay for phospholipase C from *Bacillus cereus* », Analytical Biochemistry, vol. 229, p. 313-316, 1995.

[22] Fricker, M., Reissbrodt, R. et Ehling-Schulz, M., « Evaluation of standard and new chromogenic selective plating media for isolation and identification of *Bacillus cereus* », International Journal of Food Microbiology, vol. 121, p. 27-34, 2008.

[23] Macfarlane, R. G., Oakley, C.L. et Anderson, C. G., « Hæmolysis and the production of opalescence in serum and lecitho-vitellin by the α toxin of *Clostridium welchii* », Journal of Pathology, vol. 52, p. 99–103, 1941.

[24] McGaughey, C.A. et Chu, H.P., « The egg-yolk reaction of aerobic sporing Bacilli », Journal of General Microbiology, vol. 2, no 3, p. 334-341, 1948.

[25] Spiwok, V., Lipovova, P., Skalova, T., Duskova, J., Dohnalek, J., Hasek, J., Russell, N.J. et Králová, B., « Cold-active enzymes studied by comparative molecular dynamics simulation », Journal of Molecular Modeling, vol. 13, p. 485-497, 2007.

[26] Bjelic, S., Brandsdal, B.O. et Aqvist, J., « Cold adaptation of enzyme reaction rates », Biochemistry, vol. 47, p. 10049-10057, 2008.

[27] Metpally, R.P.R. et Reddy, B.V.B., « Comparative proteome analysis of psychrophilic versus mesophilic bacterial species: Insights into the molecular basis of cold adaptation of proteins », BioMed Central Genomics, vol. 10, p. 11-20, 2009.

[28] Ray, M. K., « Cold-stress response of low temperature adapted bacteria. In: Stress response: a molecular biology approach », Sreedhar, A.S., Srinivas, U.K. (Eds). Research Signpost, p. 1-23, 2006.