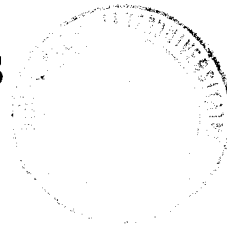


50376  
1994  
133

50376  
1994  
133

# THÈSE

présentée à  
**L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE**



pour obtenir le titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ**

*spécialité : Microbiologie*

par  
**Omar CHARAFEDDINE**

**CROISSANCE ET THERMORÉSISTANCE DE  
BACTÉRIES ISOLÉES DE PRODUITS DE LA  
MER CUISINÉS SOUS VIDE**

soutenue le 5 Avril 1994 devant la Commission d'Examen

**Président :** Professeur R. TAILLIEZ (IAAL, Lille I)  
**Rapporteurs :** Professeur F. EB (CHU, Amiens)  
Professeur R. LAURENT (IUT, Orléans)  
**Examineurs :** Professeur J.C. DERIEUX (IUT, Lille I)  
Professeur L. DUBREUIL (Pharmacie, Lille II)  
Professeur R. TOMASSONE (INA, Paris-Grignon)

3601

A la mémoire d'Abdelkbir, mon père, et  
d'Amina, ma sœur, auxquels le destin  
tragique n'a pas permis d'être là.

Omar

## REMERCIEMENTS

*Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Microbiologie de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, sous la direction de M. le Professeur Roger TAILLIEZ. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance. Il m'a soutenu dans les moments difficiles de cette thèse, avec patience, par les conseils qu'il n'a cessé de me prodiguer. Il me fait le grand honneur d'être Président de cette thèse.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement M. Philippe EB pour la qualité de son encadrement ainsi que pour son aide et ses conseils scientifiques que j'ai beaucoup appréciés durant ces années au Laboratoire.*

*J'adresse aussi mes plus vifs remerciements à M. le Professeur François EB, de la Faculté de Médecine d'Amiens, pour avoir spontanément accepté d'être Rapporteur de cette thèse.*

*Toute ma gratitude va aussi à M. le Professeur Robert LAURENT, de l'Institut Universitaire de Technologie de l'Université d'Orléans, qui a également bien voulu accepter d'être Rapporteur de ce travail, sans oublier son Equipe, qui, avec une totale disponibilité, a réalisé le logiciel mathématique pour les analyses numériques de la première partie de ce travail.*

*Je demande à M. le Professeur Jean-Claude DERIEUX, de l'Institut Universitaire de Technologie Appliquée de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, qui a accepté de juger le contenu de ce mémoire, de trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.*

*J'adresse également mes remerciements à M. le Professeur Luc DUBREUIL, de la Faculté de Pharmacie de de l'Université du Droit et de la Santé de Lille, qui me fait l'honneur de participer à ce jury d'examen.*

*Ma sincère gratitude va à M. le Professeur Richard TOMASSONE, de l'Institut National Agronomique de Paris-Grignon, pour avoir accepté de juger ce travail malgré ses nombreuses occupations.*

*L'aboutissement de cette thèse a nécessité le concours de nombreuses personnes auxquelles je tiens à exprimer ma reconnaissance :*

*- M. le Professeur Jacques VASSEUR, de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, et son Equipe, qui m'ont fait profiter de leurs compétences dans le domaine de l'électrophorèse;*

*- M. Franck DUQUENOY, Chercheur à l'I.U.T. d'Orléans, qui a particulièrement contribué à l'élaboration du logiciel mathématique pour l'analyse numérique;*

*- L'équipe du Centre d'Expérimentation et de Valorisation des Produits de la Mer, et notamment Madame Véronique MULAK pour l'envoi des souches étudiées, ainsi que Monsieur Pierre MALLE, du Centre d'Etudes Vétérinaires et Alimentaires de Boulogne-sur-Mer;*

*Je n'oublie certes pas tous les membres du Laboratoire de Microbiologie - et en particulier M. Max BECHET - qui m'ont apporté aide et sympathie;*

*- Je tiens enfin à exprimer ma profonde reconnaissance à ma mère, à toute ma famille, ainsi qu'à M. Gérard FOLLAIN, pour leur précieux soutien tout au long de cette thèse.*

## CROISSANCE ET THERMORÉSISTANCE DE BACTÉRIES ISOLÉES DE PRODUITS DE LA MER CUISINES SOUS VIDE

---

### Résumé

Six souches bactériennes (bactéries non sporulantes) isolées de filets et de terrines de poisson, ayant résisté à un traitement de pasteurisation, ont été étudiées du point de vue de leur physiologie de croissance et de leur thermorésistance (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* 1 & 2, *Micrococcus varians* et *Pseudomonas paucimobilis*).

L'étude de la croissance a été entreprise dans un milieu composé d'extraits solubles de poisson et sur des filets de lieu noir. Les durées des phases de latence ainsi que les différents paramètres des cinétiques de croissance ont été déterminés grâce à une technique de lissage, qui utilise la fonction spline. Dans les produits dont le pH est voisin de 8,2 ou inférieur à 5,5, on constate un ralentissement, voire une inhibition de la croissance de la microflore aux basses températures.

L'étude expérimentale du traitement thermique montre qu'*Enterococcus faecium* est la bactérie la plus thermorésistante ( $D_{60} = 6,5$  minutes et  $z = 9,6$  °C); dans ces conditions, *Staphylococcus aureus* est la bactérie la plus facilement détruite ( $D_{60} = 1,3$  minute et  $z = 6,2$  °C). Pour détruire de façon significative la bactérie de référence (*Enterococcus faecium*), dans le milieu artificiel à base d'extraits solubles de poisson, il faut appliquer une valeur pasteurisatrice minimale  $P_{70}^{9,6} = 5,31$  minutes.

Pour simuler une cuisson insuffisante, où les bactéries ne sont pas détruites après traitement à 60°C, une population de  $10^3$  bactéries / g a été maintenue après pasteurisation dans des filets de lieu noir stockés à 2°C et 7°C : le traitement thermique prolonge la durée de conservation, mais l'évolution de la contamination est relativement plus rapide dans les échantillons de poisson dont le pH initial n'a pas été modifié (pH = 6,4).

Enfin, une analyse électrophorétique bidimensionnelle des protéines bactériennes a révélé des différences biochimiques importantes chez les bactéries ayant subi un traitement thermique à 60°C.

---

**Mots clés : Bactéries d'altération, croissance, pH, température, pasteurisation, thermorésistance, protéines.**

## GROWTH AND HEAT RESISTANCE OF BACTERIA ISOLATED FROM VACUUM - COOKED SEAFOOD

---

### Abstract

Six non-sporulating bacterial strains isolated from fish fillets and terrines, which were refractory to a pasteurisation treatment, were studied under the aspects of their growth physiology and heat resistance (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* 1 & 2, *Micrococcus varians* and *Pseudomonas paucimobilis*).

Growth kinetics were conducted in either a medium consisting of soluble fish extracts (Fish medium) or pollack fillets (*Pollachius virens*). Durations of lag phases as well as the different parameters of growth kinetics were determined through an equalizing process using the spline function. Products with a pH close to 8.2 or less than 5.5 slowed down or even inhibited micro-organisms growth at low temperatures.

An experimental study of thermic treatment showed that *Enterococcus faecium* was the most heat-resisting bacterium ( $D_{60} = 6.5$  min and  $z = 9.6^{\circ}\text{C}$ ). Under these conditions, *Staphylococcus aureus* was the most easily destroyed bacterium ( $D_{60} = 1.3$  min and  $z = 6.2^{\circ}\text{C}$ ). To eliminate significantly the reference bacterium (*Enterococcus faecium*) in the artificial Fish medium, a minimal value of  $P_{70}^{9.6} = 5.31$  minutes was required.

To simulate an insufficient cooking time (bacteria not destroyed after treatment at  $60^{\circ}\text{C}$ ) a population of about  $10^3$  bacteria/g was kept, after pasteurisation, in pollack fillets stored at  $2^{\circ}\text{C}$  and  $7^{\circ}\text{C}$ . The thermic treatment increased the storage limit, but the evolution of contamination was relatively faster in fish samples with an unaltered initial pH (pH = 6.4).

A bi-dimensional electrophoretic analysis of bacterial proteins eventually evidenced significant biochemical differences for bacteria having undergone a thermic treatment at  $60^{\circ}\text{C}$ .

---

**Keywords :** Alteration bacteria, growth, pH, temperature, pasteurisation, heat resistance, proteins.

# TABLE DES MATIERES

<b>ABREVIATIONS</b> .....	5
<b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....	6
<b>PARTIE I</b>	
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	9
<b>I.- LA REGLEMENTATION DES PLATS CUISINES A L'AVANCE SOUS VIDE, CRITERES BACTERIOLOGIQUES</b> .....	11
<b>II.- FLORE BACTERIENNE CARACTERISTIQUE DES PRODUITS DE LA MER</b>	12
1.- Localisation des bactéries .....	13
2.- Microflore et environnement .....	13
3.- Microflore dominante dans les produits transformés .....	14
4.- Altération microbienne des produits de la mer .....	15
<b>III.- EVOLUTION DES BACTERIES DANS LES PRODUITS DE LA MER</b> .....	17
A.- Paramètres influençant le développement des micro-organismes .....	18
1.- Influence de l'activité de l'eau ( $a_w$ ) .....	18
2.- Incidence du pH .....	18
3.- Influence de la température .....	20
4.- Autres facteurs .....	21
B.- Etude particulière du temps de latence .....	22
1.- Mesure de la croissance par analyse numérique; détermination du temps de latence .....	25
a.- Interpolation .....	25
a.1.- Définition générale .....	25
a.2.- Spline d'interpolation d'ordre q .....	26
a.3.- Spline cubique .....	27
b.- Ajustement .....	28
b.1.- Spline d'ajustement d'ordre 2 .....	29
b.2.- Expression du polynôme .....	29
b.3.- Détermination de la phase de latence .....	30
<b>IV.- RESISTANCE DES BACTERIES A LA CHALEUR</b> .....	33
1.- Les lois de destruction thermique .....	33
a.- Première loi : Influence du temps de traitement .....	33
b.- Deuxième loi : Influence de la température .....	39
c.- Notion de valeur pasteurisatrice .....	41
2.- Facteurs affectant la thermorésistance des micro-organismes .....	41
a.- Résistance caractéristique des micro-organismes .....	42

b.- pH .....	43
c.- Activité de l'eau ( $a_w$ ) .....	43
<b>BUTS DU TRAVAIL</b> .....	46
<b>PARTIE II</b>	
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	47
<b>I.- CULTURES BACTERIENNES</b> .....	47
1.- Les souches étudiées .....	47
2.- Procédé d'identification des bactéries .....	48
3.- Conservation des souches .....	48
4.- Milieux de culture (Annexe IV.1) .....	48
a.- Milieux synthétiques .....	48
b.- Milieu expérimental à base de poisson : milieu Fish .....	49
<b>II.- LA CROISSANCE</b> .....	50
1.- Culture en biophotomètre .....	50
2.- Culture sur table d'agitation .....	51
3.- Mesure de la densité optique et comptage des bactéries .....	52
4.- Préparation des cultures .....	52
a.- Pré-cultures .....	52
b.- Cultures .....	52
5.- Etude des facteurs limitant la croissance .....	53
a.- Température .....	53
b.- pH .....	53
6.- Exploitation des résultats .....	53
<b>III.- ETUDE DE LA THERMORESISTANCE</b> .....	54
1.- Préparation de la suspension .....	54
2.- Tubes TDT .....	55
3.- Protocole expérimental .....	55
4.- Régulation du bain d'eau chaude .....	55
5.- Mesures des paramètres DT et z .....	55
6.- Dénombrements .....	56
<b>IV.- EVOLUTION DE LA CROISSANCE DES BACTÉRIES DANS DES FILETS DE POISSON APRÈS TRAITEMENT THERMIQUE</b> .....	56
1.- Analyse microbiologique .....	56
2.- Protocole expérimental .....	56
3.- Préparation de la suspension .....	57
<b>V.- ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTÉINES BACTERIENNES AVANT ET APRES TRAITEMENT THERMIQUE</b> .....	57
1.- Culture et préparation bactériennes .....	57
2.- Lyse bactérienne .....	58



3.-Extraction des protéines .....	59
4.- Séparation des protéines par électrophorèse. (Electrophorèse bidimensionnelle) .....	59
a.- Electrophorèse de première dimension ou isoélectrofocalisation (IEF) .....	60
b.-Electrophorèse de 2ème dimension, en présence de SDS .....	61
5.- Révélation des protéines .....	61
6.- Lecture des gels.....	62

## **PARTIE III**

### **RESULTATS ET COMMENTAIRES .....**

64

#### **CHAPITRE 1**

#### **ETUDE CINÉTIQUE DE LA CROISSANCE .....**

64

#### **I.- RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE EN LABORATOIRE DES BACTÉRIES SÉLECTIONNÉES .....**

66

1.- <i>Enterococcus faecium</i> .....	66
a.- Conditions optimale de croissance à pH 7,2 .....	66
b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C .....	67
2.- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	67
a.- Conditions optimales de croissance à pH 7,2.....	67
b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C .....	68
3.- <i>Yersinia enterocolitica 1</i> .....	69
a.- Conditions optimales de croissance à pH 7,2.....	69
b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C .....	70
4. <i>Yersinia enterocolitica 2</i> .....	70
a.- Conditions optimale de croissance à pH 7,2 .....	70
b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C .....	71
5.- <i>Micrococcus varians</i> .....	72
a.- Conditions optimales de croissance à pH 7,2.....	72
b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C .....	73
6.- <i>Pseudomonas paucimobilis</i> .....	73
a.- Conditions optimale de croissance à pH 7,2 .....	73
b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C .....	74
7.- Commentaires et conclusion .....	74

#### **II.- COMPORTEMENT AUX BASSES TEMPÉRATURES DES BACTÉRIES SÉLECTIONNÉES .....**

76

1.- <i>Enterococcus faecium</i> .....	76
a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°C, 5°C et 7°C .....	76
b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C .....	77
c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C .....	78
2.- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	78
a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°C, 5°C et 7°C .....	78
b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C .....	79
c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C .....	80

3.- <i>Yersinia enterocolitica</i> 1.....	80
a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°C, 5°C et 7°C.....	80
b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C.....	81
c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C.....	81
4.- <i>Yersinia enterocolitica</i> 2.....	82
a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°, 5° et 7°C.....	82
b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C.....	83
c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C.....	83
5.- <i>Micrococcus varians</i> .....	84
a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°, 5° et 7°C.....	84
b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C.....	85
c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C.....	85
6.- <i>Pseudomonas paucimobilis</i> .....	86
a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°, 5° et 7°C.....	86
b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C.....	87
c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C.....	87
7.- Commentaires et conclusion.....	88

## CHAPITRE 2

### ETUDE EXPERIMENTALE DE LA THERMORESISTANCE..... 90

1.- <i>Enterococcus faecium</i> .....	92
2.- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	94
3.- <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	96
3.a.- <i>Yersinia enterocolitica</i> 1.....	96
3.b.- <i>Yersinia enterocolitica</i> 2.....	98
4.- <i>Micrococcus varians</i> .....	100
5.- <i>Pseudomonas paucimobilis</i> .....	102
6.- Commentaires et conclusion.....	104
7.- Détermination des valeurs pasteurisatrices minimales à appliquer.....	105

## CHAPITRE 3

### EVOLUTION DE LA CROISSANCE DES BACTERIES DANS DES FILETS DE POISSON APRES TRAITEMENT THERMIQUE..... 108

#### I.- QUALITE INITIALE DES FILETS AVANT TRAITEMENT..... 108

#### II.- EVOLUTION QUANTITATIVE DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE AU COURS DU TEMPS..... 109

a.- <i>Enterococcus faecium</i> .....	111
b.- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	113
c.- <i>Yersinia enterocolitica</i> 1.....	114
d.- <i>Yersinia enterocolitica</i> 2.....	115
e.- <i>Micrococcus varians</i> .....	116
f.- <i>Pseudomonas paucimobilis</i> .....	117

<b>III.- COMMENTAIRES</b> .....	118
<b>CHAPITRE 4</b>	
<b>ESSAIS PRELIMINAIRES EN VUE DE L'ETUDE DES PROTEINES BACTERIENNES AVANT ET APRES TRAITEMENT THERMIQUE</b> .....	121
<b>I.- OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE DE L'EXTRACTION DES PROTEINES</b> .....	121
<b>II.- ANALYSE ELECTROPHORETIQUES DES PROTEINES AVANT ET APRES TRAITEMENT THERMIQUE</b> .....	122
1. <i>Enterococcus faecium</i> .....	125
2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	125
3. <i>Yersinia enterocolitica 1</i> .....	129
4. <i>Yersinia enterocolitica 2</i> .....	132
5. <i>Micrococcus varians</i> .....	134
6. <i>Pseudomonas paucimobilis</i> .....	137
<b>III.- COMMENTAIRES</b> .....	139
<b>CONCLUSION GENERALE</b> .....	142
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	145
<b>ANNEXES</b> .....	166

## ABREVIATIONS

---

APS	:	persulfate d'ammonium
DTT	:	dithiothréitol
FAA	:	formaldéhyde, éthanol, acide acétique
Fish	:	extraits solubles de poisson
IEF	:	isoélectrofocalisation
Mi	:	<i>Micrococcus varians</i>
PDA	:	pipérazine di-acrylamide
Ps	:	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>
Sa	:	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDS	:	sodium dodécylsulfate
St	:	<i>Enterococcus faecium</i>
TCA	:	acide trichloroacétique
TEMED	:	N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylène diamine
UKS	:	urée, carbonate de potassium, SDS
Y1	:	<i>Yersinia enterocolitica</i> 1
Y2	:	<i>Yersinia enterocolitica</i> 2

---

## INTRODUCTION GENERALE

---

Le consommateur souhaite des produits alimentaires de bonne qualité organoleptique mais sans risque pour la santé. Le contrôle de la qualité microbiologique des aliments est donc l'un des facteurs essentiels de la sécurité du consommateur, préoccupation majeure des programmes de santé établis ces dernières années tant sur le plan national qu'au niveau international. Des organismes comme la F.A.O., l'O.M.S, la F.D.A., mais aussi les Etats eux-mêmes, se préoccupent d'établir des critères permettant de définir une flore normale propre à chaque catégorie de produit. Le contrôle consiste alors à dénombrer les microflores et à comparer les résultats obtenus à des normes établies.

Le conditionnement sous vide a pour but principal de protéger les aliments de l'air et des micro-organismes. C'est dans les années trente qu'apparaissent les premières traces d'utilisation de la technique de conditionnement sous vide (PRALUS, 1985). Par ailleurs, c'est lors du développement de l'industrie de la pétrochimie, dans les années quarante, que sont apparus des dérivés pétrochimiques, notamment le saran (dérivé du polychlorure de vinyle); ce matériau inerte, imperméable à l'eau et aux gaz, pouvait être utilisé pour protéger les produits de l'air, et augmenter leur durée de vie. Avec ce matériau débute l'essor industriel de la cuisson sous vide (GOUSSAULT, 1988).

Avec les progrès techniques et scientifiques, avec l'évolution des habitudes culinaires et des goûts des consommateurs, qui souhaitent consacrer moins de temps à la cuisine, la technique de conditionnement sous vide s'est considérablement développée au cours de ces 10 dernières années, libérant ainsi l'individu d'une partie des contraintes alimentaires. Cette technique apporte même, selon GOUSSAULT (1988) un enrichissement à la palette des goûts. Les produits cuits sous vide acquièrent une force gustative qui ne leur était pas coutumière, et que révélait à peine l'ancêtre de cette technique, la cuisson en papillote.

Depuis plusieurs années, les plats cuisinés à l'avance sont destinés, soit à la consommation familiale, soit à la restauration collective. On assiste depuis quelques années à une nouvelle évolution avec l'apparition de la cuisine d'assemblage qui consiste, pour les restaurants, à recevoir séparément les différents composants des plats principaux sous forme pré-cuite, éventuellement déjà portionnés et conditionnés sous vide (ROSSET et al., 1986).

Dans son principe, la cuisson sous vide consiste en un traitement thermique modéré (65 à 100°C) effectué après conditionnement des produits frais ou crus dans des sachets

thermorésistants. La cuisson s'effectue en milieu humide et à pression atmosphérique, de manière à détruire la quasi-totalité des formes végétatives des micro-organismes contaminants.

La cuisson sous vide est un procédé qui permet de conserver pendant une période déterminée (6, 15, 21 jours, ou même davantage) des plats cuisinés frais qui ont été préparés puis conditionnés sous vide avant cuisson. En effet, l'emballage préalable assure la protection du produit contre les contaminations extérieures, les effets de l'oxydation et les pertes d'eau. Il faut donc nettement distinguer ce procédé du conditionnement sous vide, pour lequel la cuisson s'effectue préalablement à la mise sous vide.

Enfin, sur le plan microbiologique, la cuisson dans l'emballage évite les contaminations après cuisson et permet de mieux maîtriser la conservation des produits.

Il est nécessaire que l'hygiène soit respectée tout au long des différentes étapes de préparation des produits. Il faut une liaison constante entre chaque opération, sans rupture brutale des températures. Il ne faut jamais oublier que même si l'on respecte les températures à tous les niveaux, une mauvaise hygiène au départ peut entraîner des risques, car le vide ne supprime pas la contamination initiale des denrées. Les produits bruts doivent donc être d'une extrême fraîcheur et d'une qualité bactériologique parfaite.

Par ailleurs, les produits doivent être conservés le minimum de temps avant cuisson, et cette cuisson doit se dérouler immédiatement après la mise sous vide.

Les normes d'hygiène portent également sur la propreté des locaux, des matériels utilisés et du personnel (arrêté du 26 juin 74, concernant la préparation, la conservation, la distribution et la vente des plats cuisinés à l'avance).

Le procédé dit "cuisson sous vide" est une technique qui s'applique essentiellement à l'industrie de la viande, du poisson frais, des charcuteries et en particulier du jambon cuit (R.T.V.A., 1983). Elle est encore peu utilisée pour les plats à base de produits de la mer et spécialement de poisson, dont on sait qu'il fait partie des denrées alimentaires les plus fragiles et les plus périssables, ceci étant dû au fait qu'il s'agit d'un produit très hydraté renfermant en outre un taux important d'azote non protéique (MALLE, 1992).

Il y a encore quelques années, en raison des difficultés de conservation du poisson et des risques d'altération des qualités organoleptiques et bactériologiques des plats à durée de conservation limitée, on ne trouvait le poisson sous vide que non cuisiné, ou bien sous forme surgelée à des températures voisines de  $-20^{\circ}\text{C}$ , mais surtout sous forme de conserves en boîte pour les conservations de longue durée. On assiste toutefois depuis quelque années à l'arrivée sur le marché d'autres formes de commercialisation du poisson, et notamment de plats préparés grâce aux techniques de pasteurisation (cuisson qui consiste à détruire la presque totalité des formes végétatives). (Note de service du 31 Mai 1988 N° 8106 et annexes, Doc. N° 2) (Annexe III)

La cuisson sous vide présente de nombreux avantages : cependant, si la technologie est mal maîtrisée, notamment si le barème de cuisson est insuffisant et si les conditions de conservation ne sont pas respectées, des risques de développement de bactéries dangereuses pour le consommateur ou de bactéries d'altération rendant les aliments impropres à la consommation sont toujours à craindre.

Les barèmes de cuisson sous vide actuellement utilisés dans l'industrie sont définis de manière empirique et peuvent être très différents : certains industriels cuisent à des températures à coeur faibles, de l'ordre de 65°C, afin de préserver les qualités gustatives du poisson, alors que d'autres travaillent à des températures à coeur élevées, de l'ordre de 85°C, afin de ne prendre aucun risque sur le plan microbiologique. Des barèmes ont été définis sur le plan réglementaire (note de service du 31 mai 1988 de la Direction Générale de l'Alimentation), mais ils sont généraux et ne prennent pas en compte les caractères spécifiques de chaque produit.

Dans cette étude, on a essentiellement tenu compte des aspects microbiologiques: on a cherché à déterminer l'influence des paramètres physico-chimiques (température et pH) sur les bactéries isolées après pasteurisation de plats à base de poisson, on a ensuite déterminé les valeurs pasteurisatrices minimales à appliquer pour détruire les formes végétatives des bactéries en proportion suffisante. Le comportement des bactéries thermorésistantes au cours de la conservation a ensuite été étudié en appliquant un traitement standard. On s'est enfin intéressé à l'état physiologique des bactéries après un traitement thermique.

*PARTIE I*  
**ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**



## PARTIE I

### ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

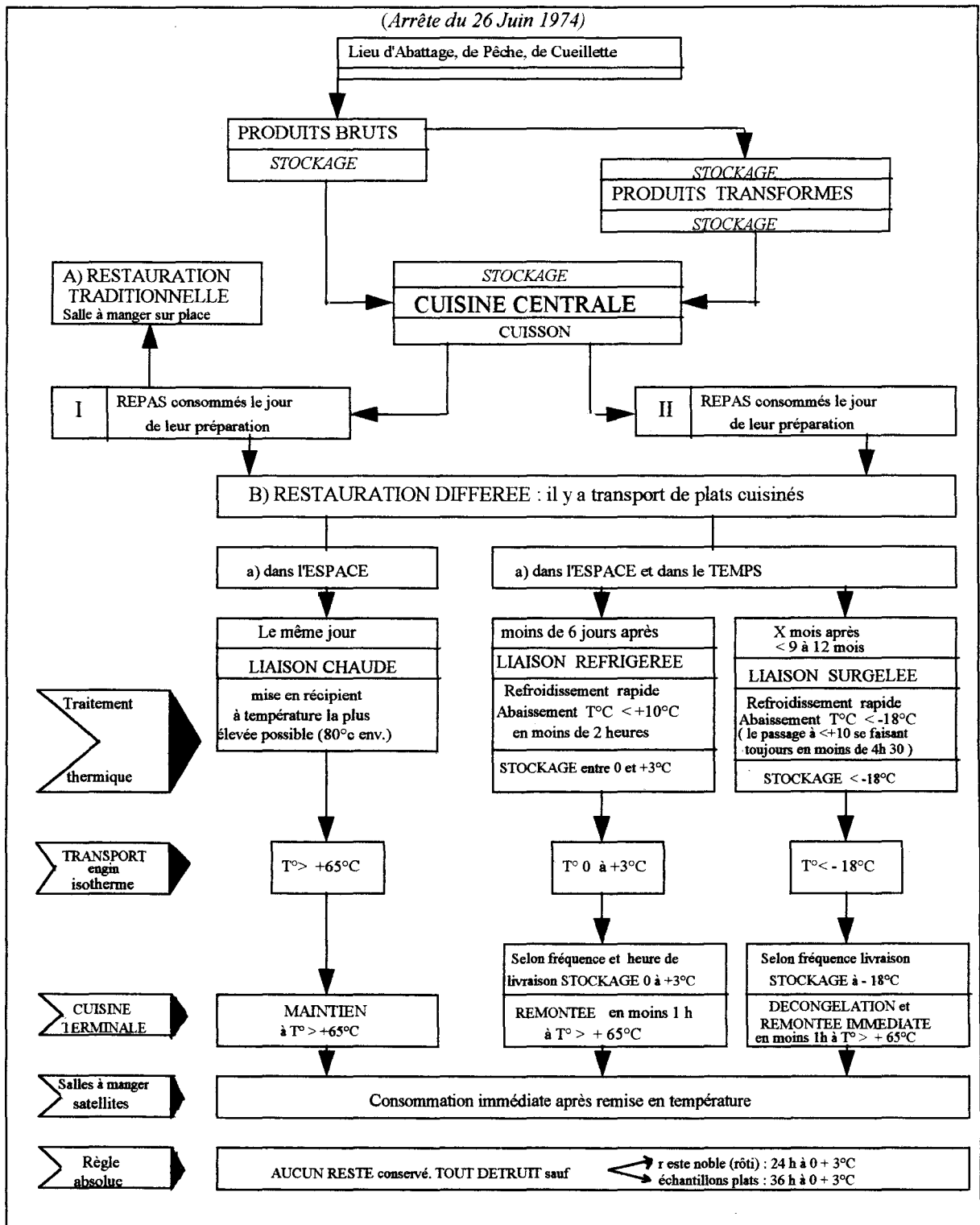
---

Les bactéries contaminant les plats cuisinés sous vide à base de produits de la mer constituent un groupe écologique particulier. Elles appartiennent surtout aux micro-organismes aérobies psychrotrophes genre *Pseudomonas*, *Vibrio*... (HOBBS et HODGKISS, 1982; KIMURA, 1991). On trouve aussi des micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs (formes végétatives et spores) comme le genre *Clostridium* (LECLERC, 1975), mais également des micro-organismes pathogènes comme *Staphylococcus aureus* (ABGRALL, 1988 et McMEEKIN, 1992) et *Yersinia enterocolitica* (KENDALL et GILBERT, 1979; MULAK, 1990). Leur originalité tient à leur faculté de résister à certains facteurs : au temps et à la température de cuisson (environ 65°C) mais surtout aux conditions du milieu après cuisson (manque d'oxygène, température de stockage). Dans de nombreux plats, ces micro-organismes pathogènes interviennent dans le phénomène de toxi-infection; certains auteurs (HOBBS et GILBERT, 1974) ont montré que le risque de toxi-infections alimentaires pouvait apparaître pour des populations variant de  $10^5$  à  $10^6$  par gramme pour *Staphylococcus aureus* et de  $10^4$  à  $10^5$  par gramme pour *Clostridium perfringens*. Ces bactéries pathogènes sont présentes dans les locaux en nombres et en espèces variables selon les conditions de milieu. On note cependant qu'au début de la préparation, l'activité des bactéries est réduite car leur nombre est faible.

LEBERT et ROSSET, 1974, ont donné les différents cheminements possibles pour les plats cuisinés à l'avance après cuisson. Ils sont schématisés sur le tableau I.1 ci-après, qui précise les normes de cuisson et de conservation. Ces normes sont également applicables aux produits cuits sous vide.

En fin de cuisson, le plat est donc, soit au moins à 65°C (liaison chaude), soit stocké et transporté à des températures comprises entre 0 et 3°C (liaison réfrigérée), soit soumis à un refroidissement rapide jusqu'à une température égale ou inférieure à -18°C (liaison surgelée) (GAUTHIER R. 1989). Le froid ne tue pas les microbes; il ne fait qu'inhiber leur développement, mais chaque bactérie, chaque moisissure ou chaque levure reprend vie, se multiplie et sécrète sa toxine dès que la température dépasse la valeur à laquelle a débuté la mise en sommeil.

Tableau n° I.1 : LA REGLEMENTATION CONCERNANT LES PLATS CUISINES A L'AVANCE.  
 (Circuits et traitements thermiques subis par l'aliment depuis sa production jusqu'à sa consommation)



## **I.- LA REGLEMENTATION DES PLATS CUISINES A L'AVANCE SOUS VIDE, CRITERES BACTERIOLOGIQUES**

En France, les critères d'appréciation de l'état hygiénique des plats cuisinés à l'avance sous vide sont réglementés par de nombreux textes officiels (Annexe I)

Les groupes microbiens étudiés ont été retenus sur certains critères :

- soit à cause du danger particulier, sur le plan médical, des bactéries présumées pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*,

- soit à cause de leur intérêt d'indicateur : *Enterococcus faecalis*,

- soit pour la facilité de leur caractérisation : bactéries mésophiles ou flore microbienne totale : *Pseudomonas paucimobilis*, *Micrococcus varians*,

Les opérations de préparation et de cuisson sont réglementées par l'arrêté du 26 Juin 1974 et la note de service du 31 Mai 1988 relatifs aux plats cuisinés à l'avance (Annexes II et III).

Un plat est reconnu propre à la consommation s'il correspond aux critères microbiologiques suivants (Article 3 du décret n° 71-636 du 21 juillet 1971) :

### **Bactéries pathogènes**

*Salmonella* absence dans 25 g de produit.

Staphylocoques  
présumés pathogènes moins de 100 bactéries au gramme (0 dans 1cg).

### **Bactéries témoins de contamination fécale**

Coliformes moins de 1000 bactéries au gramme de produit.  
(moins de 100 dans 1 dg)

*Escherichia coli* moins de 10 bactéries au gramme. (0 dans 1 dg)

Anaérobies sulfite-réducteurs  
(formes végétatives + spores)  
(incubation à 46°C) moins de 30 bactéries au gramme de produit.

**Bactéries aérobies à 30°C**

au plus 300 000 bactéries au gramme de produit.

(30-32°C, 72h)

## **II- FLORE BACTERIENNE CARACTERISTIQUE DES PRODUITS DE LA MER**

Les poissons, les crustacés et les mollusques sont parmi les produits alimentaires les plus périssables. Cela est dû au fait qu'ils contiennent plus d'eau que la viande, plus de composés azotés non protéiques, et un pH élevé, entre 6,1 et 6,9 selon les espèces, alors qu'il est de l'ordre de 5,5 chez les mammifères (SAINCLIVIER, 1983).

Les premiers changements survenant après la mort sont dus aux enzymes tissulaires et digestives (SAINCLIVIER, 1983). Les produits issus de l'action enzymatique constituent les premiers substrats de la croissance bactérienne, essentiellement responsable de la dégradation du poisson.

L'altération, qui commence dès la mort, est un processus complexe mettant en jeu des phénomènes physiques, chimiques et bactériologiques, et plusieurs approches peuvent être envisagées pour évaluer le niveau de l'altération : sensorielle, chimique ou microbiologique.

Le contrôle de la qualité des produits de la mer est focalisé sur la qualité microbiologique des produits, dont l'évaluation est le critère officiel essentiellement utilisé pour déterminer le degré de l'altération alimentaire. Ce critère permet aussi d'apprécier l'état sain d'un produit et son innocuité pour le consommateur. L'analyse sensorielle est aussi utilisée, mais toutefois difficile à interpréter (EINARSSON, 1991; PEDROSA-MENABRITO, 1990). L'utilisation de la méthode chimique ne connaît pas un grand essor, elle n'est pas généralisée et reste limitée au niveau des laboratoires de recherche : les travaux de HOLLINGWORTH et al., 1991; YAMANAKA, 1990 et MALLE, 1992, ont montré que cette méthode est efficace pour apprécier la qualité des produits de la mer, notamment la fraîcheur des poissons.

D'après l'étude bibliographique, ce sont les micro-organismes qui sont les principaux responsables de l'altération des produits de la mer (LISTON, 1982). Les muscles des poissons marins vivants sont normalement stériles (PROCTOR, NICKERSON, 1935, et SHEWAN, 1962). SHEWAN, 1977 a d'ailleurs montré qu'un muscle prélevé stérilement et maintenu à 0°C se conserve plus de 6 semaines sans modification organoleptique détectable. Mais dès la mort, les muscles sont le siège d'un processus d'altération rapide sous l'action principale des micro-organismes (LISTON, 1982). Le problème primordial est donc bien la qualité microbiologique des produits de la mer.

Les crustacés et les mollusques s'altèrent plus rapidement que le poisson, du fait de leur taille qui est généralement plus petite que celle des poissons : en effet, ils ne sont pas eviscérés

après la capture, ils sont donc rapidement soumis à une autolyse enzymatique, et ils sont plus riches en acides aminés, ce qui favorise le développement bactérien (EARLY et STROUD 1982).

### 1.- Localisation des bactéries

Les bactéries se localisent au niveau des parties de l'animal qui sont en contact permanent avec le milieu environnant.

L'évolution de l'animal dans son milieu naturel permet aux bactéries de s'adsorber sur la peau, d'envahir les branchies, les tractus intestinaux, et donc de se trouver dans les parties du corps en contact avec l'eau.

Les dénombrements effectués par SHEWAN, 1962, montrent que les zones de contamination hébergent une flore plus ou moins abondante, allant de  $10^2$  à  $10^5$  bactéries/cm<sup>2</sup> au niveau de la peau, de  $10^3$  à  $10^7$  bactéries/cm<sup>2</sup> au niveau des branchies et de  $10^3$  à  $10^8$  bactéries/cm<sup>2</sup> au niveau de la surface intestinale.

A la mort de l'animal, les bactéries envahissent le muscle à partir des branchies, de la peau et des intestins (SHEWAN, 1971) et cela après une phase de latence de 3 à 4 jours à 0°C (SHEWAN, 1962).

LISTON, 1980, a noté que l'essentiel de l'activité bactérienne est localisée en surface et, d'une manière générale, que les bactéries pénètrent plus vite dans les filets que dans le poisson entier.

### 2.- Microflore et environnement

La flore bactérienne des produits de la mer reflète celle de l'environnement dans lequel ils vivent (SHEWAN, HORSLEY, 1977) et l'on trouve approximativement dans le poisson les espèces bactériennes identifiées dans les eaux (SAINCLIVIER, 1983); elle dépend de la température, qui est liée à la zone de pêche, mais aussi de la salinité, de la concentration en oxygène dissout et du pH (HORSLEY, 1977).

Dans les **eaux froides** ou **tempérées** (0°C à 15°C : Mer du Nord, Norvège et Canada), la flore se trouvant à la surface du poisson et en contact avec l'eau est essentiellement dominée par les bactéries psychrotrophes, Gram négatif, aérobies strictes ou aérobies-anaérobies appartenant aux genres : *Pseudomonas*, *Moraxella* / *Acinetobacter*, *Flavobacterium* / *Cytophaga* et *Vibrio* (GEORGALA, 1957, HOBBS et HODGKISS, 1982).

SHEWAN, 1971, a effectué une étude comparative de la flore bactérienne du poisson frais de la Mer du Nord de l'année 1960 et de l'année 1970, il a constaté que certaines bactéries

voient leur pourcentage augmenter : c'est le cas des *Pseudomonas*, qui passent de 16 % à 22 %, et des *Moraxella / Acinetobacter*, qui passent de 23 % à 41 %, alors que d'autres espèces voient leur pourcentage baisser comme les *Flavobacterium / Cytophaga*, qui passent de 27 % à 10 %, et les *Micrococcus*, qui passent de 4 % à 1 %.

La flore intestinale dépend du mode de nutrition (HUSS, 1988) : elle est constituée de bactéries mésophiles à Gram négatif, contient des aéro-anaérobies facultatives appartenant aux genres : *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shigella*, *Aeromonas* et *Escherichia* (SHEWAN, 1977). Elle comprend aussi quelques bactéries aérobies strictes comme les *Pseudomonas*, qui sont capables de se multiplier également dans des conditions d'anaérobiose, et par conséquent dans un muscle au moment de l'altération, en fournissant elles-mêmes l'oxygène, par le biais de la dénitrification ou par la réduction de l'oxyde de triméthylamine (SKOVGAARD, 1979).

Sur les poissons pêchés dans les **eaux tièdes** (20°C à 30°C : océans Indien, Pacifique et quelques eaux australiennes), ce sont principalement des Gram positifs mésophiles qui prédominent, appartenant aux genres *Micrococcus*, *Bacillus* et bactéries *Corynéformes* (GILLESPIE, 1975; SHETTY, 1990).

Chez les poissons des **zones tropicales**, ces genres sont parfois dominants et la flore totale est essentiellement mésophile.

Dans les poissons des **eaux chaudes** (Inde, côtes sud d'Afrique, Australie...) le pourcentage de mésophiles (*Bacillus*, *Micrococcus* et *Corynéformes*) est plus élevé.

La flore dominante du poisson pêché dans les eaux d'Australie correspond au genre *Micrococcus* (GILLESPIE et MACREE, 1975).

### 3.- Microflore dominante dans les produits transformés

Au cours de sa transformation, le poisson subit une nouvelle contamination, constituée essentiellement de bactéries mésophiles : *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica* ... (SHEWAN, 1971), et de bactéries psychrotrophes apportées par les eaux de rinçage.

Après préparation des plats cuisinés sous vide et stockage dans les réfrigérateurs, les bactéries psychrotrophes dominées par le genre *Pseudomonas* peuvent se développer suivant une croissance logarithmique, après une phase de latence plus ou moins longue selon l'état de choc des bactéries, leur nombre, et la température de conservation. Ces bactéries sont responsables des odeurs d'ammoniac et de sulfure. Leur croissance est positive à - 5°C/ - 6°C et leur temps de génération est de 10 à 30 heures à 0°C (SHEWAN et MURRAU, 1979).

L'ensemencement de fragments de muscles, prélevés stérilement, par des cultures pures de bactéries, isolées de poisson altéré, a permis de déterminer les espèces bactériennes les plus actives, ainsi que les substrats utilisés et les métabolites produits.

Les bactéries d'altération responsables des odeurs et des saveurs caractéristiques des produits altérés ne représentent qu'environ 10% de la flore totale de contamination (ADAMS et al.,1964). Les travaux de VAN SPREEKENS, 1977, cités par LISTON, 1980, confirment que les bactéries impliquées dans ces phénomènes sont les *Pseudomonas*. Leur action se traduit par la formation de métabolites, souvent à l'origine de l'apparition des mauvaises odeurs.

Quantitativement, l'évolution de la flore est caractérisée par la dominance des *Pseudomonas / Acinetobacter* et *Flavobacterium* (LISTON,1980). Le tableau I.2 illustre cette évolution.

Durée du stockage (jours)	Flore aérobie mésophile (/cm <sup>2</sup> , 25°C)	<i>Pseudomonas</i> spp %	<i>Alteromonas putrefaciens</i> %	<i>Moraxella / Acinetobacter</i> %	<i>Flavobacterium</i> %	<i>Coryneformes</i> %	<i>Brochotryx thermophacta</i> %
0	4,2 10 <sup>4</sup>	26,2	0,6	13,8	53,1	5,5	
2	6,9 10 <sup>4</sup>	75,2		3,6	12,4	8,8	
5	5,0 10 <sup>5</sup>	100,0					
8	1,4 10 <sup>7</sup>	100,0					
11	8,8 10 <sup>7</sup>	91,6	0,8				7,6

**Tableau I.2 :** Evolution de la flore microbienne de steaks d'espadon (*Xiphias gladius*), conditionnés sous air et stockés à 3,5°C (LANNELONGUE et col., 1982)

La dominance des *Pseudomonas* s'explique par leur aptitude à croître aux températures de réfrigération (temps de génération de l'ordre de 10 à 20 heures à 0°C) et par leur capacité d'utiliser des constituants de la chair, notamment des composés azotés non protéiques (LISTON, 1980) dont le catabolisme génère des composés chimiques d'altération.

#### 4.- Altération microbienne des produits de la mer

Chez les poissons, la grande variabilité de la composition du muscle est à prendre en considération lors d'une altération. Celle-ci est variable d'une espèce à l'autre selon la taille, la saison (OGUNSUA,1990), et chez un même individu, elle varie selon les muscles, l'âge, le cycle sexuel, l'alimentation, et l'environnement.

a.- La composition des muscles est en relation avec leurs fonctions :

-Les muscles "rouges", qui interviennent dans la locomotion des poissons, contiennent plus de lipides et moins de protéines que les muscles blancs.

-L'évolution sexuelle cyclique a un impact important sur la composition des muscles : ainsi, chez les Téléostéens, par suite de l'utilisation des réserves lors de la croissance des gonades et en période de jeûne plus ou moins complet lié à la ponte, les lipides atteignent leur seuil minimal.

-Lorsque l'alimentation est abondante, il y a une augmentation de la teneur en protéines du tissu musculaire, suivie d'une augmentation de la teneur en lipides.

La dégradation des tissus musculaires des poissons s'effectue selon des réactions de glycolyse, de lipolyse et de protéolyse. Les métabolites les plus anciennement identifiés sont les amines volatiles appelées azote basique volatil total (ABVT). Elles résultent du catabolisme des protéines d'une part, et d'autre part de la réduction de l'oxyde de Triméthylamine (TMAO) en Triméthylamine (TMA).

b.- Le catabolisme des protéines constitue la phase primordiale. Les protéines sont hydrolysées en polypeptides et en peptides, puis en amino-acides libres dont la quantité totale augmente dans le muscle, et ces amino-acides libres sont métabolisés selon 2 voies principales : des décarboxylations conduisant à la formation d'amines dont certaines sont volatiles, et des désaminations entraînant la production d'ammoniac. Mais une faible production d'ammoniac peut aussi résulter de l'autolyse, qui augmente très rapidement avec l'activité bactérienne (SOUDAN et al. 1965, SAINCLIVIER, 1983).

c.- Les espèces de *Pseudomonas* sont les principales responsables de la dégradation des acides aminés, qui provoque l'augmentation superficielle du pH. La réduction de l'oxyde de triméthylamine en triméthylamine est une réaction d'altération bactérienne et il y a une relation entre le développement de la population bactérienne et la production de TMA (BEATTY et GIBBONS, 1937).

De nombreux micro-organismes sont capables de réduire TMAO en TMA lorsque l'oxygène vient à manquer, vers le sixième jour de la conservation (SAINCLIVIER, 1983). Sous l'action d'un enzyme bactérien, le TMAO est activé pour être par la suite réduit par de nombreuses deshydrogénases des cellules bactériennes (TARR, 1939); l'enzyme permet l'oxydation des acides lactique ou pyruvique ou des glucides musculaires; le produit de la réaction (hydrogène) est cédé au TMAO. Grâce à cette réaction, les micro-organismes non fermentatifs peuvent se développer dans les tissus en condition micro-aérophile, voire anaérobie, (Hobbs, 1982). Ils subissent de manière déterminante l'influence du pH et du substrat et la réaction se fait entre le pH 6,0 et le pH 8,0 avec un optimum entre 7,2 et 7,4.



Le dosage de TMA est souvent effectué pour évaluer l'état de fraîcheur des poissons (CONWAY 1962; MALLE et al. 1986/87; EINARSOON, 1991), le poisson étant jugé inconsommable à un taux de 15 mg de TMA / 100g de chair (SAINCLIVIER, 1983). Le dosage de TMA chez les poissons qui s'acidifient rapidement après la mort (thonidés) ou qui s'alcalinisent (groupe des raies et requins) n'est pas représentatif de l'altération.

D'autres métabolites en petite quantité proviennent également de l'altération bactérienne: diméthylamine (DMA) et monométhylamine (MMA) (DYER et MOUNSEY, 1945). Ces métabolites sont produits à des températures négatives (CASTELL et al 1973).

d.- La monométhylamine, la diméthylamine, la triméthylamine et l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) sont des composés azotés présentant en commun la basicité et la volatilité. Ce sont des éléments de l'azote basique volatil total (ABVT) dont la TMA et le  $\text{NH}_3$  forment la part essentielle. La plupart d'entre eux sont responsables du développement d'odeurs putrides.

Outre la production d'amines volatiles, il y a production d'amines biogènes correspondant aux amines non volatiles telles que la putrescine, la cadavérine, l'histamine, la spermine, la spermidine, la tyramine, qui proviennent de la décarboxylation des acides aminés par les enzymes microbiens et tissulaires (RAGUENES, 1988; ABABOUCHE et al., 1991).

L'augmentation de la concentration en amines biogènes traduit le développement microbien, qui est le facteur essentiel dans le processus d'altération du poisson, et peut donc permettre l'évaluation de la fraîcheur du poisson (GOUYGOU et al, 1989; OKUZUMI, 1990).

Sur le plan organoleptique, les composés les plus importants sont les composés sulfurés volatiles : sulfure d'hydrogène  $\text{H}_2\text{S}$ , diméthyl sulfure  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$ , méthyl mercaptan  $\text{CH}_3\text{SH}$ , produits à partir des acides aminés soufrés : cystéine, cystine et méthionine (SHEWAN, 1976). Les seuils d'apparition des odeurs sulfurées sont très faibles : 40 p.p.b pour  $\text{H}_2\text{S}$ , 0,5 p.p.b pour  $(\text{CH}_3)_2\text{S}$  et 0,05 p.p.b pour  $\text{CH}_3\text{SH}$  (HERBERT, 1975, SHEWAN, 1977).

Ces odeurs sont essentiellement produites par les *Pseudomonas* des groupes III et IV type putrefaciens (classification de SHEWAN et col., 1960) et occasionnellement par *P. fluorescens* et *P. fragi* (HERBERT 1975). *Pseudomonas fragi* serait également responsable de l'apparition d'odeurs fruitées du fait de la dégradation de certains amino-acides (glycine, leucine, et sérine) en esters d'acides gras (SHEWAN 1977).

Les bactéries les plus actives dans la dégradation sont les *Pseudomonas* (OKUZUMI, 1990) et plus particulièrement genre *Shewanella* (HOBBS 1983, SHEWAN 1971).

### III.- EVOLUTION DES BACTERIES DANS LES PRODUITS DE LA MER

Plusieurs éléments connus depuis longtemps influencent le développement de la flore bactérienne des plats à base de produits de mer. Il s'agit entre autres de l'activité de l'eau, de l'oxygène, du pH, de la température : dans ce travail, on s'intéressera surtout à ces deux derniers facteurs.

#### A.- Paramètres influençant le développement des micro-organismes

##### 1.- Influence de l'activité de l'eau ( $a_w$ )

L'eau est utilisée pour la croissance, la majorité des produits frais ont une activité de l'eau de 0,970 à 0,996 (JAY, 1986); le poisson a une  $a_w$  de 0,990 - 0,994 (CHIRIFE et al., 1982). Cet intervalle est favorable au développement bactérien.

Tout abaissement de l' $a_w$  affecte le taux de croissance bactérien; la plupart des bactéries ont un taux optimum autour de 0,990 à 0,995. Pour des valeurs plus basses, la croissance est ralentie, ainsi *Staphylococcus aureus* a un taux de croissance réduit à 10% de son maximum pour une  $a_w$  de 0,900 (BEUCHAT, 1983).

La diminution de l' $a_w$  entraîne un phénomène de plasmolyse de la cellule. *Staphylococcus aureus* perd 50% de son eau intracellulaire quand l' $a_w$  passe de 0,995 à 0,950 (KOUJIMA, 1978). Ce phénomène diminue ou arrête la croissance des micro-organismes par inhibition de l'activité enzymatique.

##### 2.- Incidence du pH

Le pH renforce plus ou moins la qualité du stockage, en réglant l'équilibre entre ses différentes formes, mais il exerce un effet propre sur les bactéries. Les bactéries se développent sur des milieux dont le pH varie de 4,5 à 9 (Tableau I.3), mais avec un optimum de 6,5 à 7,5 (JAY, 1986; CARLIER, 1983). Le pH limite inférieure de croissance des bactéries est de l'ordre de 4,1 et dépend des autres constituants. Au delà de ce pH, la durée de la phase de latence de la culture diminue.

Le pH influe sur les réactions chimiques et biochimiques, et par conséquent sur les micro-organismes : les bactéries acétiques ou lactiques se développent à des pH faibles (inférieurs à 3,5) contrairement aux bactéries de contamination favorisées dans les plats moins acides. Les travaux de MAGRINI et al., 1983, montrent que *Staphylococcus aureus* résiste à des pH de l'ordre de 4,2, mais ils observent une forte réduction de la croissance pour une diminution de ce paramètre de 6 à 5,4; par conséquent, toute baisse de pH diminue le nombre de bactéries.

	Minimum	Optimum	Maximum
Bactéries en général	3,2	6,5 - 7,5	11
Bactéries acétiques	4,0	5,4 - 6,3	9,2
Bactéries lactiques	3,2	5,5 - 6,5	10,5
<i>Pseudomonas</i>	5,6	6,6 - 7,0	7,0
Entérobactéries	5,6	6,5 - 7,5	9,0
<i>Staphylococcus</i>	4,2	6,8 - 7,5	9,3
<i>Clostridium</i>	4,6 - 5,0		9
<i>Bacillus</i>	5 - 6	6,8 - 7,5	9,4 - 10

Tableau I.3 : pH limites de croissance de quelques micro-organismes  
(d'après JAY, 1986; CARLIER, 1983)

Le pH oriente le métabolisme (MESCLE, ZUCCA, 1989):

-Aux pH acides, les ions magnésium forment des complexes insolubles; aux pH basiques ce sont le zinc, le calcium et les ions ferriques qui sont complexés. Sous cette forme, ces ions indispensables comme cofacteurs d'enzymes sont difficilement utilisables.

-Le pH peut aussi agir sur la perméabilité membranaire en affectant les variations en ions  $H^+$  et  $OH^-$ . En milieu acide, les perméases cationiques sont saturées en ions hydrogène, ce qui limite le transfert des cations indispensables. En milieu alcalin ce sont les ions hydroxydes qui saturent la membrane, empêchant le transfert des anions indispensables.

-Enfin toute variation du pH cytoplasmique va entraîner un ralentissement de l'activité enzymatique et de la croissance.

Le pH de la chair de poisson est en général plus élevé que celui de la viande (BANWART, 1981; JAY, 1986). Cette différence est due en partie à l'épuisement des réserves de glycogène lors de la capture, pendant laquelle le poisson se débat. Pendant la conservation, le pH a tendance à augmenter par libération de  $NH_3$  et d'amines diverses. Ce phénomène est bien sûr lié à la nature de la chair du poisson et aux micro-organismes putrifians qui se

développent; on reviendra sur ce phénomène dans les résultats de croissance.

On note par ailleurs que le pH des crustacés est généralement plus élevé que celui des poissons : 6,8 à 7,4 pour le crabe et 7,1 à 8,2 pour les crevettes (BANWART, 1981).

L'utilisation des bactéries lactiques représente une méthode biologique de préservation des aliments par la capacité de ces bactéries d'inhiber la flore d'altération. Les effets inhibiteurs sont attribués à la baisse du pH, ainsi qu'à la production de peroxyde d'hydrogène et de bactériocines (HANNA, 1980; GILLIAN, 1975; BREMER, 1983)

Toutefois, les ferments lactiques ne survivent que peu de temps dans les produits marins stockés à basse température; les essais de préservation de produits utilisant des ferments lactiques n'ont pas donné de résultats encourageants. En effet, BAMA, 1985, a constaté que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus plantarum* diminuent rapidement sur la chair de poisson après trois jours de stockage au froid. Mais on utilise comme additifs les acides lactique et acétique, dont l'activité antibactérienne est assez large (INGRAM, 1989; ARYANTA, 1991; SHEPENS, 1991).

### 3.- Influence de la température

La température est l'un des facteurs les plus importants agissant sur le développement des micro-organismes (CHANDRASEKHARAN et al., 1991) et a une application presque généralisée dans la conservation des produits frais comme des produits congelés.

La plupart des micro-organismes peuvent croître à des températures plus ou moins proches de la température ambiante (supérieure ou égale à 20°C); mais d'une façon générale, les cellules bactériennes peuvent proliférer à des températures comprises entre - 18°C et 90°C. A ces valeurs extrêmes, la croissance est limitée, mais l'activité métabolique peut être détectée. Ainsi, chez *Pseudomonas fragi*, une activité lipasique a été mise en évidence après 4 jours d'incubation à - 7°C, après 7 jours à - 18°C et même après 21 jours à - 29°C.

- La majorité de la flore de contamination des denrées réfrigérées est psychrotrophe. Les psychrotrophes et les psychrophiles peuvent se développer à des températures faibles proche de 1°C et sont caractérisés par un métabolisme lent (STANFIELD et al., 1985). Leur vitesse de croissance lente leur permet d'envahir les milieux alimentaires en 1 à 3 semaines, avec un temps de génération de l'ordre de 24 h à 0°C. La plupart sont sans effet, mais quelques uns sont pathogènes.

- Les bactéries mésophiles sont par contre décelées dans les aliments conservés à température ambiante, ou dans les aliments réfrigérés lorsque la chaîne du froid a été rompue. Leur taux de croissance est élevé et la durée de prolifération relativement courte. C'est surtout dans ce groupe que l'on trouve les espèces pathogènes pour l'homme et l'animal.

- Le dernier groupe est constitué des bactéries thermophiles, qui sont capables de se développer à des températures allant de + 45°C à 65°C. Leur taux de croissance est très élevé, leur durée de croissance est courte et elles sont susceptibles de se développer à des températures élevées.

La connaissance de ces facteurs a permis de développer des matériels de préparation de plats cuisinés sous vide. La température de conservation, par exemple, doit être maintenue à une valeur de l'ordre de 3°C favorable à la non-multiplication bactérienne.

#### 4.- Autres facteurs

\* Certains aliments contiennent naturellement des substances antimicrobiennes, c'est le cas du lysozyme de blanc d'oeuf qui hydrolyse la paroi des cellules bactériennes.

Parfois l'utilisation de certaines substances permet de stabiliser un aliment et d'empêcher la prolifération microbienne (MESCLE et ZUCCA, 1989; CURRAN et al., 1990). Parmi les additifs utilisés pour empêcher la prolifération des bactéries, on utilise de nombreuses molécules telles que les citrates, les butylhydroxyanisols, le butylhydroxytoluène ou la nisine. TAYLOR et al., 1990, rapportent dans leurs travaux que la nisine agit sur *Clostridium botulinum E.* et retarde l'apparition de la toxine.

Enfin les emballages des plats cuisinés sous vide empêchent tout échange avec le milieu extérieur, mais la flore aérobie de contamination est capable de se multiplier en condition d'anaérobiose en utilisant d'autres voies métaboliques (NOTTINGHAM, 1982).

Les produits cuits sous vide se conservent d'autant mieux que l'étanchéité de l'emballage est bonne, car le fait de réduire la pression partielle en oxygène au contact des aliments exerce une action inhibitrice sur la microflore d'altération. VALIN et LACOURT, 1980, dans leur travaux sur la croissance de la flore totale de steaks hachés conservés à + 6°C et conditionnés soit sous film perméable, soit sous vide, ont constaté que l'évolution de la flore totale est beaucoup plus importante lorsque le conditionnement est fait sous film perméable : le temps de latence est de seulement 1 jour et la population finale atteint  $10^{10}$  bactéries /  $\text{cm}^2$ . Par contre, la conservation sous vide met en évidence un temps de latence de 3 jours et une population finale inférieure à  $10^9$  bactéries /  $\text{cm}^2$ . En effet, l'oxygène qui subsiste à l'intérieur de l'emballage après conditionnement est progressivement consommé par les phénomènes respiratoires tissulaires et bactériens (NOTTINGHAM, 1982) et remplacé par du gaz carbonique. L'association de ces deux effets (disparition de l'oxygène et accumulation de gaz carbonique) est responsable de l'inhibition de la flore aérobie d'altération.

L'inhibition des bactéries aérobies de surface par un conditionnement sous vide se traduit par une augmentation de leur phase de latence, une diminution de leur vitesse de

multiplication et une diminution de leur densité maximale. Cette inhibition résulte de l'action simultanée de la disparition de l'oxygène et de l'accumulation de gaz carbonique. Le gaz carbonique semblerait agir sur les membranes cellulaires en modifiant leur propriétés. Cette action est à rapprocher de l'action de certains gaz anesthésiques qui se fixent dans les zones hydrophobes des membranes cellulaires et provoquent leur gonflement, s'opposant ainsi à l'absorption des substrats.

Il semblerait que la faible disponibilité en oxygène soit le principal facteur inhibiteur (NEWTON et RIGG, 1979). NOTTINGHAM (1982) confirme que si le gaz carbonique ralentit la multiplication des *Pseudomonas*, leur inhibition totale suppose l'élimination de la quasi-totalité de l'oxygène.

L'utilisation de pellicules relativement peu perméables provoque une multiplication lente des *Pseudomonas*. On observe une attaque des substrats protéiques et l'apparition de la putréfaction lorsque le nombre de *Pseudomonas* atteint  $10^6$  bactéries /  $\text{cm}^2$  alors qu'en aérobiose, il faut atteindre  $10^8$  bactéries /  $\text{cm}^2$  pour observer ce type d'altération. Cette différence peut s'expliquer par plusieurs facteurs :

- l'anaérobiose favorise la multiplication des Lactobacilles et d'autres bactéries fermentaires qui utilisent le glucose : en l'absence de glucose, les *Pseudomonas* utilisent les acides aminés.

- le fait que les *Pseudomonas* se multiplient à vitesse réduite en raison de la basse pression en oxygène supprime vraisemblablement le phénomène de répression catabolique et permet l'utilisation des acides aminés en présence du glucose (NEWTON et RIGG, 1979; NOTTINGHAM, 1982).

## **B.- Etude particulière du temps de latence**

L'étude du comportement d'une souche ou d'une communauté microbienne en culture peut renseigner sur les valeurs de certains paramètres biologiques importants tels que le temps de latence ou le taux de croissance. Ainsi peut être évaluée la capacité d'adaptation et de développement d'une souche ou d'une communauté microbienne à un environnement donné. Mais cette démarche nécessite des allers et retours fréquents entre l'expérimentation et l'interprétation des phénomènes observés. Elle demande en particulier une étape de formulation, qui consiste à traduire en termes de modèle numérique des résultats expérimentaux difficiles à exploiter et à analyser (LAURENT et POVET, 1979; LAURENT, 1985).

Si l'on trace la courbe représentant le logarithme du nombre de cellules en fonction du temps,  $\log N = f(t)$ , on obtient le tracé de la figure I.1.

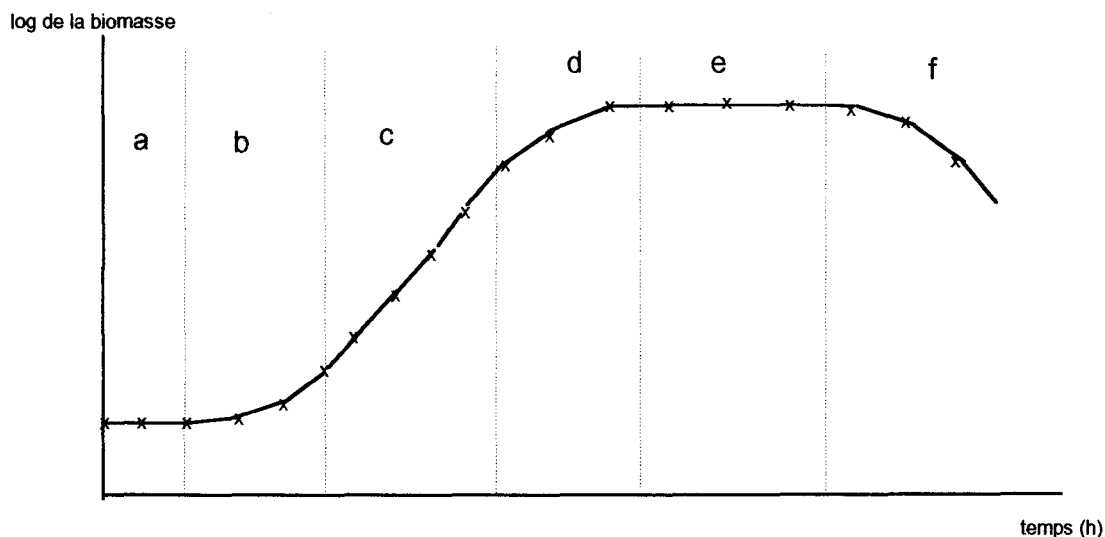


Figure n° I.1 : Courbe de croissance bactérienne

- a = phase de latence
- b = phase d'accélération
- c = phase exponentielle
- d = phase de décélération
- e = phase stationnaire maximale
- f = phase de déclin

L'accroissement de population peut donc être exprimé par :

$$dN = N \cdot \mu \cdot dt \text{ et } \mu = \frac{1}{N} \cdot \frac{dN}{dt}$$

où  $N$  est la concentration cellulaire, et où  $\mu$ , qui est un facteur dépendant du micro-organisme et des conditions de culture, représente la vitesse spécifique de croissance. Si cette vitesse spécifique de croissance est constante (et uniquement dans ce cas), ce qui a lieu lors de la phase exponentielle, on peut écrire :

$$\mu = \frac{\text{Log}N - \text{Log}N_0}{t}$$

Dans ce cas,  $\mu$  est appelé **taux népérien de croissance**. Il peut être défini graphiquement ( $\mu = f(t)$ ) comme étant la pente au niveau de la zone de proportionnalité directe de la courbe.

Les différentes phases de la courbe peuvent donc être définies ainsi :

- la phase a, où  $N$  reste identique à  $N_0$  : phase de **latence** caractérisée par  $\mu = 0$ ;
- la phase b, ou phase d'**accélération** :  $N$  augmente,  $\mu$  augmente;
- la phase c, où  $N$  augmente en fonction du temps de façon exponentielle.  $\log N$  est proportionnel à  $t$ . C'est la phase **exponentielle** où  $\mu$  est maximal et  $G$  (temps de génération) est constant;
- la phase d, dite de **décélération** ou de ralentissement: l'augmentation de  $N$  est faible,  $\mu$  diminue.
- la phase e, où  $N$  est à son maximum et s'y maintient. C'est la phase **stationnaire** avec  $\mu = 0$ ;
- la phase f, où  $N$  diminue proportionnellement à  $t$ . Elle est appelée phase de **déclin** ou de mortalité. Les cellules meurent et l'on pourrait définir un taux de mortalité.

La détermination de la phase de latence est essentielle pour maîtriser la conservation des denrées alimentaires; il faut déterminer, selon les conditions de préparation et de température, la durée de cette phase de latence où les bactéries de contamination ne peuvent pas se développer et où elles présentent moins de risques pour le consommateur, particulièrement dans le cas où leur nombre est faible .

Cette phase, que l'on va décrire de façon détaillée, est une phase d'adaptation caractérisée au départ par une multiplication nulle, mais avec un développement individuel intense. Elle correspond à une grande activité métabolique des bactéries (nombreuses synthèses, essentiellement enzymatiques), que l'on peut apprécier en dosant séparément l'A.D.N. (Acide DesoxyriboNucléique) et l'A.R.N. (Acide RiboNucléique) dans la cellule.

Au cours de cette phase, le taux de croissance est nul ( $\mu = 0$ ); elle peut être caractérisée différemment selon l'espèce bactérienne et le milieu. C'est ainsi que :

- Certaines bactéries s'adaptent plus facilement au milieu que d'autres : dans ce cas, c'est un facteur d'ordre génétique qui permet aux bactéries une adaptation plus rapide.

- Plus la concentration initiale ( $N_0$ ) est importante, plus la phase de latence est réduite.

- Lorsque des bactéries sont prélevées en début de phase exponentielle et sont introduites dans un milieu neuf, la phase de latence peut être extrêmement courte; mais elle est au contraire prolongée avec des bactéries provenant d'une culture en phase stationnaire ou en phase de déclin.

- un inoculum cellulaire, prélevé en phase exponentielle de croissance et introduit dans un milieu neuf de composition chimique identique, se multiplie instantanément sans aucune phase de latence. En revanche, si les constituants nutritifs (source de carbone, source d'azote)



sont différents, on observe à nouveau une phase de latence; celle-ci traduit l'absence d'enzymes nécessaires à l'utilisation de ces nouveaux substrats et la nécessité pour la cellule de les synthétiser.

Dans certains cas, on observe également, dans une population bactérienne donnée, une augmentation de la taille des cellules pendant la phase de latence. Lorsque la taille est suffisante, la division s'amorce. Le rapport ADN / ARN est à son maximum juste avant la division, l'appareil nucléaire déclenche la division lorsqu'il atteint une masse suffisante.

La détermination de cette phase de latence - essentielle pour établir la période de conservation des plats cuisinés - s'avère plus difficile sur une analyse directe des courbes de croissance. Elle est d'autant plus difficile pour des cultures à basses températures, où les prélèvements périodiques, allant de quelques heures à plusieurs jours selon la température, ne permettent pas de déterminer cette phase avec une précision suffisante. C'est la raison pour laquelle des méthodes d'analyse mathématique ont récemment vu le jour. Une méthode d'analyse numérique préconisée par LAURENT (1972), PELLETIER (1972) et DUQUENOY (1993) permet en particulier de tenir compte de toutes ces variations et, à partir d'un modèle mathématique, de déterminer les différents paramètres de croissance avec plus de précision.

### 1.- Mesure de la croissance par analyse numérique; détermination du temps de latence

Dans sa définition, l'analyse numérique est l'étude des méthodes permettant d'évaluer numériquement un (ou des) nombres, une (ou des) fonctions (GOURDIN et BOUMAHMAT, 1983).

L'approximation polynômiale ordinaire ne conduit pas toujours à des résultats satisfaisants, notamment lorsque le degré des polynômes est élevé. Par contre, l'utilisation des fonctions splines évite cet inconvénient. C'est pourquoi l'on trouvera dans le système ci-après deux aspects importants de l'approximation (ATTEIA et PRADEL, 1990) : l'interpolation et l'ajustement par des fonctions splines (DE BOOR, 1978).

#### a.- Interpolation

L'interpolation est un outil auxiliaire de premier plan de l'analyse numérique, notamment dans l'intégration et la dérivation numériques, la résolution d'équations différentielles, etc.(BAKHVALOV, 1976).

### a.1.- Définition générale

Soient  $n$  abscisses distinctes appartenant à l'intervalle  $[a, b]$  telles que :

$$a < t_1 < t_2 < \dots < t_n < b$$

et  $n$  nombres réels  $z_i, i = 1 \dots n$ . En général les valeurs  $z_i$  représentent les valeurs en  $t_i$  d'une certaine fonction  $f$ .

L'interpolation consiste à substituer à  $f$  une fonction qui, pour les valeurs  $t_i$ , prenne les valeurs  $z_i, i = 1 \dots n$ . On peut chercher comme fonction un polynôme dont le degré ne dépasse pas  $n-1$ , c'est alors l'interpolation polynômiale classique. Le remplacement de  $f$  permet ainsi :

- si  $f$  est connue mais d'expression analytique compliquée, de lui substituer une fonction aisément calculable;

- si  $f_n$  est mesurée pour les abscisses  $t_i, i = 1 \dots n$ , de permettre une évaluation approchée de  $f$  pour  $t \neq t_i$ .

Cette méthode peut présenter de graves inconvénients : il est toujours difficile de manipuler numériquement des polynômes de degré élevé et le polynôme aura tendance à osciller de façon anormale entre les abscisses  $t_i$ . Pour remédier à cette difficulté, on préfère subdiviser  $[a, b]$  en  $p$  intervalles et, dans chacun de ces  $p$  intervalles, pratiquer une interpolation polynômiale de faible degré (2, 3, 4...): c'est l'interpolation polynômiale par morceau (méthode utilisée pour l'exploitation des résultats de cette étude). Il reste alors le problème du raccordement des différents morceaux, mais pour lever cette difficulté, on peut utiliser l'interpolation par des fonctions "splines" (DUC-JACQUET, 1968 ; PETIT, 1971). C'est en fait une interpolation polynômiale par morceaux, mais avec raccordement des dérivées entre les divers morceaux : non seulement la fonction interpolante est continue sur  $[a, b]$  mais un certain nombre de ses dérivées le sont aussi.

En général, les morceaux de polynômes seront de degré  $q$  ( $q = 2, 3, 4, 5, 6$ ).

### a.2.- Spline d'interpolation d'ordre $q$

Soient  $n$  abscisses fixes et distinctes appartenant à l'intervalle  $[a, b]$  telles que :

$$a < t_1 < t_2 < \dots < t_n < b$$

On montre (LAURENT, 1972) que parmi toutes les fonctions appartenant à l'espace de SOBOLEV  $H^q$   $]a, b[$  (fonctions réelles, définies sur  $]a, b[$  et leurs dérivées d'ordre  $q$  sommables sur  $]a, b[$  pour  $q \geq 2$ ), il en existe une et une seule, notée  $u$ , qui minimise le critère suivant :

$$I_0(\omega) = \int_a^b (\omega)^{(2)}(t)^2 \cdot dt$$

et qui soit telle que

$$\omega(t_i) = z_i \quad i = 1, \dots, n$$

où  $z_i$  sont les points expérimentaux.

et où  $\omega^{(q)}$  est la dérivée de  $\omega$  à l'ordre  $q$

La solution à ce problème est appelée **fonction spline d'interpolation** d'ordre  $q$  et elle vérifie les propriétés suivantes :

P1 :  $u$  est un polynôme de degré  $2q-1$  sur chaque intervalle  $]t_i, t_{i+1}[$   $i = 1 \dots n$ .

P2 :  $u$  est un polynôme de degré  $q-1$  sur chaque intervalle  $]a, t_1[$  et  $]t_n, b[$ .

P3 : Les dérivées à l'ordre  $k$  pour  $k$  allant de  $q$  à  $2q-1$  sont nulles aux instants  $t_1^+$  et  $t_n^-$ :

$$\omega^{(k)}(t_1^+) = \omega^{(k)}(t_n^-) = 0 \quad k = q, \dots, 2q-1$$

P4 : La dérivée à l'ordre  $2q-2$  inclus est continue sur  $]a, b[$ , c'est à dire :

$$\omega^{(2q-2)}(t_i^-) = \omega^{(2q-2)}(t_i^+)$$

Pour chaque intervalle, la fonction spline  $u$  est déterminée : son expression est un polynôme de degré  $(2q-1)$ , dont il faut déterminer les coefficients  $2q$ .

Dans ce cas,  $q = 2$ , la fonction spline d'interpolation cubique est utilisée : on développe alors la méthode.

### a.3.- Spline cubique

Entre deux points expérimentaux  $z_i$  et  $z_{i+1}$  correspondant aux instants  $t_i, t_{i+1}$ , on fait passer un polynôme  $u$  d'ordre 3 tel que :

$$- u(t_i) = z_i$$

$$- u(t_{i+1}) = z_{i+1}$$

Le polynôme passe par les points expérimentaux.

La dérivée seconde du polynôme  $u_i = \omega^{(2)}$  est continue sur l'ensemble de la courbe  $]a, b[$ .

Pour chaque intervalle, on utilise un polynôme d'ordre 3, la dérivée seconde peut alors s'écrire :

$$\omega''(t) = \frac{u_i}{h_i}(t_{i+1} - t) + \frac{u_{i+1}}{h_i}(t - t_i) \quad \text{pour tout } t \in [t_i, t_{i+1}]$$

on pose  $u_0 = u_n = 0$  (cf. P3)

et  $h_i = t_{i+1} - t_i, i = 1, \dots, n-1$

$$u_i = \omega''(t_i)$$

En exprimant que la dérivée de  $\omega$  est continue en  $t_i, (i = 2, \dots, n-1)$  on a :

$$\frac{h_{i-1}}{6}u_{i-1} + \frac{h_{i-1} + h_i}{3}u_i + \frac{h_i}{6}u_{i+1} = \frac{\omega(t_{i+1}) - \omega(t_i)}{h_i} - \frac{\omega(t_i) - \omega(t_{i-1}))}{h_{i-1}} \quad (1)$$

En écrivant la relation précédente, pour tous les intervalles, les dérivées secondes  $u_i$  sont calculées en appliquant la méthode de Gauss.

En intégrant deux fois  $\omega''$  sur  $[t_i, t_{i+1}]$  on obtient :

$$\omega(t) = \frac{(t_{i+1} - t)}{6} \left[ \frac{(t_{i+1} - t)^2}{h_i} - h_i \right] u_i + \frac{t - t_i}{6} \left[ \frac{(t - t_i)^2}{h_i} - h_i \right] u_{i+1} + \frac{t_{i+1} - t}{h_i} \omega(t_i) + \frac{t - t_i}{h_i} \omega(t_{i+1})$$

pour  $t \in [t_i, t_{i+1}] \quad i = 1, \dots, n-1$

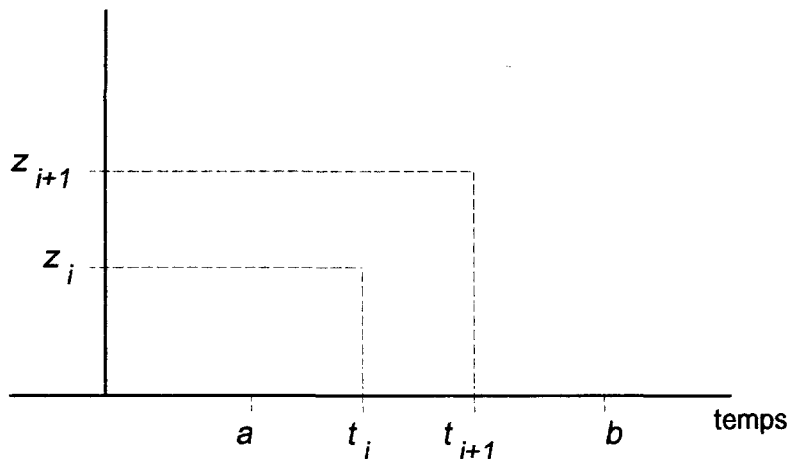


Figure n° 1.2.

Si  $N$  est le nombre de points de la courbe, il y aura  $N-1$  polynômes à déterminer. Ces polynômes sont appelés **splines cubiques d'interpolation**, ils sont utilisés pour calculer des valeurs intermédiaires.

## b.- Ajustement

Soient  $n$  abscisses distinctes appartenant à l'intervalle  $[a, b]$  telles que :

$$a < t_1 < t_2 < \dots < t_n < b$$

et  $n$  nombres réels  $z_i, i = 1 \dots n$ . En général, les valeurs  $z_i$  représentent en  $t_i$  les valeurs expérimentales d'une certaine fonction  $f$ . Ces valeurs, de par leur nature, sont souvent entachées d'erreurs. Il est intéressant dans ce cas de chercher une fonction  $f$  ne prenant pas exactement ces valeurs, mais qui réalise un compromis entre l'approximation de  $f$  et le lissage des valeurs expérimentales.

L'ajustement consiste à trouver un critère qui permet de réaliser ce compromis.

On exposera seulement le cas utilisé pour ces travaux.

### b.1.- Spline d'ajustement d'ordre 2

Pour définir le caractère lisse d'une fonction de HILBERT  $H^2 [a, b]$ , on choisit.

$$I_2(\omega) = \int_a^b [\omega^{(2)}(t_i)]^2 dt$$

De même, la quantité

$$\epsilon(\omega) = \sum_{i=1}^N [\omega(t_i) - z_i]^2$$

peut être choisie comme caractère d'approximation.

Le compromis entre le lissage et l'approximation sera réalisé lorsque l'on voudra minimiser la quantité :

$$I_2(\omega) + \rho_i \epsilon(\omega)$$

Le paramètre  $\rho_i$  mesure l'importance relative du lissage et de l'approximation.

Si  $\rho_i = 0$ , on retrouve les splines d'interpolation. Les splines d'ajustement sont également utilisés pour calculer des valeurs intermédiaires mais surtout pour lisser la courbe.

### b.2.-Expression du polynôme.

$$\text{On pose } \omega(t_i) = z_i - \rho_i \left( \omega^{(3)}(t_i^+) - \omega^{(3)}(t_i^-) \right)$$

$$\text{On a } \omega(t_i) = z_i - \rho_i \left( \frac{u_{i+1}}{h_i} - \frac{u_i - u_{i-1}}{h_{i-1}} \right) \quad (3)$$

où  $\rho_j$  est une pondération: si  $\rho_j$  est égal à zéro, on retrouve les splines d'interpolation.

En substituant  $\omega(t_j)$  dans l'équation (1) par (3), on a :

$$\begin{aligned}
 \frac{\sigma_p(t_{i+1}) - \sigma_p(t_i)}{h_i} - \frac{\sigma_p(t_i) - \sigma_p(t_{i-1}))}{h_{i-1}} &= \frac{z_{i+1} - z_i}{h_i} - \frac{z_i - z_{i-1}}{h_{i-1}} - \frac{\rho_{i-1}}{h_i - 2h_{i-1}} u_{i-2} \\
 &+ \left[ \frac{\rho_{i-1}}{h_{i-1}} \left( \frac{1}{h_{i-2}} + \frac{\rho_i}{h_{i-1}} \right) + \frac{\rho_i}{h_{i-1}} \left( \frac{1}{h_{i-1}} + \frac{1}{h_i} \right) \right] u_{i-1} \\
 &+ \left[ \frac{\rho_{i-1}}{h_{i-1}^2} + \rho_i \left( \frac{1}{h_{i-1}} + \frac{1}{h_i} \right)^2 + \frac{\rho_{i+1}}{h_i^2} \right] u_i \\
 &+ \left[ \frac{\rho_i}{h_i} \left( \frac{1}{h_{i-1}} + \frac{1}{h_i} \right) + \frac{\rho_{i+1}}{h_i} \left( \frac{1}{h_i} + \frac{1}{h_{i+1}} \right) \right] u_{i+1} \\
 &- \frac{\rho_{i+1}}{h_i h_{i+1}} u_{i+2}.
 \end{aligned} \tag{4}$$

Les inconnues  $u_2, u_3, \dots, u_{n-1}$  sont les solutions d'un système pentadiagonal symétrique, la méthode de Gauss permet de résoudre ce système. Connaissant les valeurs  $u_j$ , on calcule les valeurs du polynôme avec l'équation (2).

### b.3.- Détermination de la phase de latence

La phase de latence peut être déterminée avec précision par la méthode de LODGE et HINSWELHOOD, 1943.

En représentant le logarithme de la biomasse en fonction du temps, la phase exponentielle qui suit la phase de latence est une droite.

En effet :

$$[N] = [N_{O_e}] e^{(\mu t)}$$

$$\log[N] = \log[N_{O_e}] + \mu t$$

$[N_{O_e}]$  représente la concentration cellulaire au début de la phase exponentielle.

La durée de la phase de latence  $L_O$  est déterminée par l'intersection de cette droite avec la droite  $Y = N_{O_e}$ .

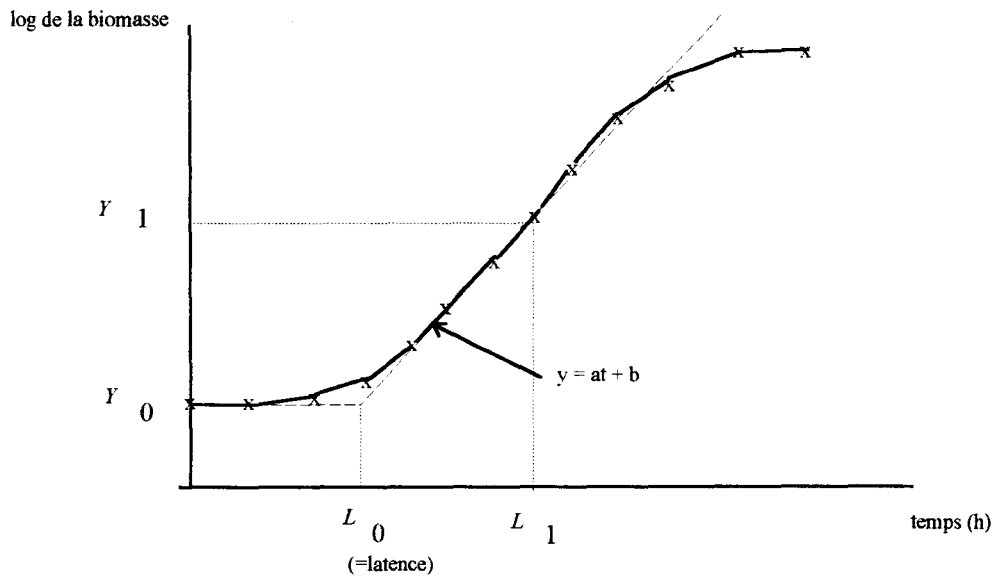


Figure n° I.3 : courbe de croissance

La détermination de  $L_1$  revient à déterminer le point d'inflexion où le taux de croissance est maximal (dérivée maximale).

A partir des paramètres  $Y$ ,  $Y_1$ , et  $Y_0$ , on peut déterminer le temps de latence.

Sachant que :

$$\begin{aligned} Y &= at + b \\ Y_1 &= aL_1 + b \\ Y_0 &= aL_0 + b \end{aligned}$$

A partir de ces équations, on peut déterminer le temps de latence  $L_0$  en calculant la valeur de  $b$ ,  $L_0$  :

$$a = \frac{Y_1 - Y_2}{L_1 - L_0} \quad \text{et} \quad b = Y_1 - aL_1$$

$$\text{donc} \quad L_0 = \frac{Y_0 - Y_1}{a} + L_1$$

L'algorithme déterminé pour le calcul des polynômes nous donne également les dérivées secondes des polynômes  $u_j$  :

Si  $u_{i+1} < 0$  et  $u_i > 0$ , le point d'inflexion de la courbe se trouve entre  $t_i$  et  $t_{i+1}$  et pour trouver le point d'inflexion, on annule la dérivée seconde de  $u(t)$ .

donc

$$\omega_i^{(2)}(t) = \frac{u_i t_{i+1} - t u_i + t u_{i+1} - t_i u_{i+1}}{t_{i+1} - t_i} = 0$$
$$t \text{ inflexion} = \frac{t_{i+1} + u_i - t_i u_{i+1}}{u_i - u_{i+1}}$$
$$= L_1$$

Sachant que :

$$\omega_i(L_1) = y_1$$

$$\omega_i^{(1)}(L_1) = \alpha : \text{dérivée du polynôme} = \text{pente de la droite.}$$

et connaissant  $L_1, Y_1$  et  $\alpha$ , on détermine le temps de latence par

$$latence = L_0 \frac{y_0 - y_1}{\alpha} - L_1$$

Ainsi la fonction spline permet de lisser correctement la courbe de croissance et d'en déterminer les paramètres avec plus de fiabilité, à partir du modèle mathématique obtenu.



## IV.- RESISTANCE DES BACTERIES A LA CHALEUR

Chaque souche bactérienne a une résistance à la chaleur qui lui est propre, dans des conditions déterminées de milieu de chauffage. La connaissance des cinétiques de thermodestruction des bactéries est à la base de l'établissement des barèmes de cuisson / pasteurisation.

On détermine la durée et la température de cuisson nécessaires pour éviter tout problème d'infection ou d'intoxication alimentaire. On calcule ainsi la valeur pasteurisatrice minimale pour chaque bactérie : cette valeur correspond au barème temps / température permettant, pour les formes végétatives d'une espèce microbienne donnée, d'atteindre le taux de destruction souhaité.

Pour les plats cuisinés à l'avance, la valeur pasteurisatrice se calcule à l'aide d'une bactérie de référence : un entérocoque, *Enterococcus faecalis*. (Note de service du 31 Mai 1988 N° 8106 et annexes, Doc. N° 2) (voir Annexe n° III).

### 1.- Les lois de destruction thermique

L'établissement des lois de destruction des micro-organismes par la chaleur conduit à définir deux paramètres : le paramètre  $D_T$  et le paramètre  $z$ . Les valeurs  $D_{65}$  ou  $D_{121,1}$  expriment le temps nécessaire pour réduire au dixième de sa valeur initiale la population d'une souche bactérienne (forme végétative ou sporulée) aux températures de référence de  $65^\circ\text{C}$  et  $121,1^\circ\text{C}$ . Plus  $D_{65}$  ou  $D_{121,1}$  est élevé, plus la thermorésistance de la souche considérée est grande.

$D_{65}$  est déterminé dans le cas d'une pasteurisation, il concerne les formes végétatives.

$D_{121,1}$  est déterminé dans le cadre d'une stérilisation et il concerne les formes sporulées.

Le paramètre  $z$ , qui est déduit de la deuxième loi de destruction des micro-organismes, exprime l'augmentation de la température nécessaire pour réduire de dix fois le temps létal de traitement. Plus  $z$  sera élevé, plus la souche sera résistante aux augmentations de température. A l'heure actuelle, en thermobactériologie, les définitions de la thermorésistance des bactéries sont très importantes pour tous les nouveaux produits alimentaires. C'est la raison pour laquelle on a jugé utile de décrire les lois de destruction des micro-organismes.

#### a.- Première loi : Influence du temps de traitement

La découverte de l'expression logarithmique caractéristique de la destruction des micro-organismes par des traitements thermiques est généralement attribuée à MADSEN et

NYMAN, 1907. Depuis, d'innombrables travaux ont démontré que la destruction thermique des micro-organismes (bactéries ou spores), ou plus précisément l'inhibition profonde des capacités de reproduction d'une monoculture homogène, correspond à une réaction d'ordre 1 (BALL et OLSON, 1957; MICHIELS et col. 1978; STUMBO, 1973; CERF, 1977).

La cinétique de destruction est analogue à une cinétique chimique du premier ordre et a pour expression:

$$-\frac{dN}{dt} = kN \quad (1)$$

( $N$ ) : Nombre de micro-organismes vivants au temps  $t$ , à une température létale constante  $T$

$\frac{dN}{dt}$  : Variation du nombre de micro-organismes en fonction du temps ou encore vitesse de la réaction représentée par la valeur de la pente négative en tout point de la courbe ( $N$ ) =  $f(t)$

$k$  : Facteur de proportionnalité, exprime la vitesse relative de destruction thermique, aussi appelée constante de vitesse de réaction à une température donnée (en minutes)

L'équation (1) peut aussi s'écrire :

$$\frac{-dN}{N} = kdt \quad (2)$$

En intégrant cette équation entre les limites du nombre des micro-organismes vivants  $N_0$  au temps  $t = 0$  et du nombre des bactéries vivantes  $N_1$  après un temps  $t$  de traitement à température constante, on obtient :

$$\int_{N_0}^N \frac{dN}{N} = -k \int_0^t dt \quad (3)$$

On obtient alors

$$\text{Log}N_0 - \text{Log}N = kt \quad (4)$$

En modifiant l'équation (4) et en passant aux logarithmes décimaux, on obtient

$$t = \frac{2,302}{k} \cdot \log \frac{N_0}{N} \quad (5)$$

où

$$\log N = \log N_0 - \frac{k}{2,302} \cdot t \quad (6)$$

Avec  $N_0$  : Nombre de bactéries au temps  $t = 0$

$N$  : Nombre de bactéries survivantes après un temps de réaction  $t$ .

La relation (6) est l'équation d'une droite, appelée **courbe de survie**.

L'inverse de la pente a pour valeur  $2,302/k$  et correspond au temps qu'il faut pour traverser un cycle logarithmique décimal, c'est-à-dire le temps nécessaire pour détruire 90 pour 100 des micro-organismes. Ce temps, représenté par la valeur  $D_T$ , permet de réduire de dix fois la population des micro-organismes à la température  $T$  de l'expérience; on peut donc écrire

$$\log N = \log N_0 - \left( \frac{1}{D_T} \right) t \quad (7)$$

ou

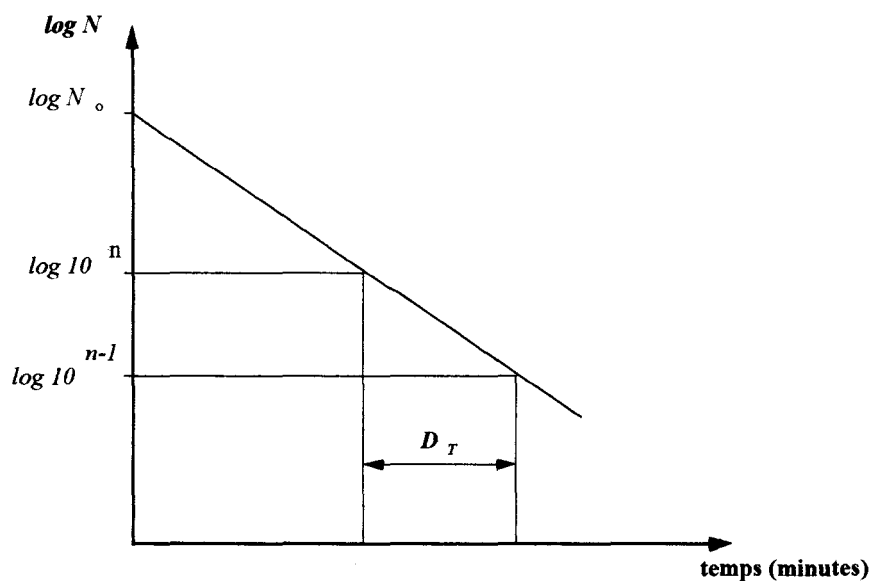
$$t = D_T \cdot \log \frac{N_0}{N} \quad (8)$$

Cette équation, connue des microbiologistes, représente la **première loi de destruction des micro-organismes**.

$t$  est le temps de chauffage en minutes à la température  $T$  (en °C)

$D_T$  est l'un des paramètres de la thermorésistance de la souche bactérienne à une température donnée. Plus  $D_T$  est grand, plus la résistance thermique est élevée (Figure I.4).

**Figure I.4** : Représentation de la courbe de survie des souches bactériennes  
(Première loi de destruction thermique des micro-organismes)



$\log N_0 / N$  peut être représenté par  $\log 10^n$  où  $10^n$  est la réduction de la population due au traitement thermique de  $t$  minutes.

L'équation (8) est également représentée par :

$$t = D_T \cdot n \quad (9)$$

$n$  : Exposant de 10 de la réduction de population

$D_T$  : Temps de réduction décimale

C'est ainsi que pour une réduction souhaitée  $N_0 / N$  d'un micro-organisme donné, on donne souvent  $P_{65}^z$  (dans le cas de pasteurisation) et  $F_{121,1}^z$  (dans le cas de stérilisation).

$D_T$  est l'élément de comparaison des thermorésistances entre différentes souches bactériennes. Il permet aussi d'évaluer l'influence des conditions d'environnement (pH,  $a_w, \dots$ ) du milieu de chauffage, par exemple sur la thermorésistance.

La première loi de destruction thermique des micro-organismes indique que les courbes de survie sont des droites en coordonnées semi-logarithmiques. Mais en pratique, on observe souvent des déviations par rapport à la droite théorique (STUMBO, 1973) (figure I.5).

Les causes de ces déviations peuvent être diverses et généralement liées au mécanisme de la destruction des micro-organismes :

-Présence dans le micro-organisme de plusieurs sites sensibles au traitement (HANSEN et RIEMAN, 1963; ALLWOOD et RUSSEL, 1970; MOATS, 1971; MAGNUS et al., 1986). Dans ce cas, la mort ne serait pas due à l'inactivation d'une seule molécule mais de plusieurs, d'où l'épaulement observé au départ.

➤ -Rassemblement des micro-organismes en amas : les travaux de STUMBO, 1973, signalent que chaque amas produit une colonie tout le temps qu'il contient au moins une cellule. C'est uniquement lorsqu'il n'y a plus de cellule viable par amas que la thermorésistance devient logarithmique. Ce phénomène d'épaulement a été observé pour les courbes de survie de *Streptococcus faecium* chauffé dans du lait, alors qu'en mélangeant énergiquement la suspension au départ du traitement thermique, les courbes de survie obtenues sont linéaires (HANSEN et RIEMAN, 1963). MAGNUS et al., 1986, ont pu observer au microscope que les épaulements des courbes de survie de *Streptococcus faecium* et *Streptococcus faecalis*, chauffés dans différents milieux, sont dus à la présence de chaînettes de 4 à 6 bactéries.

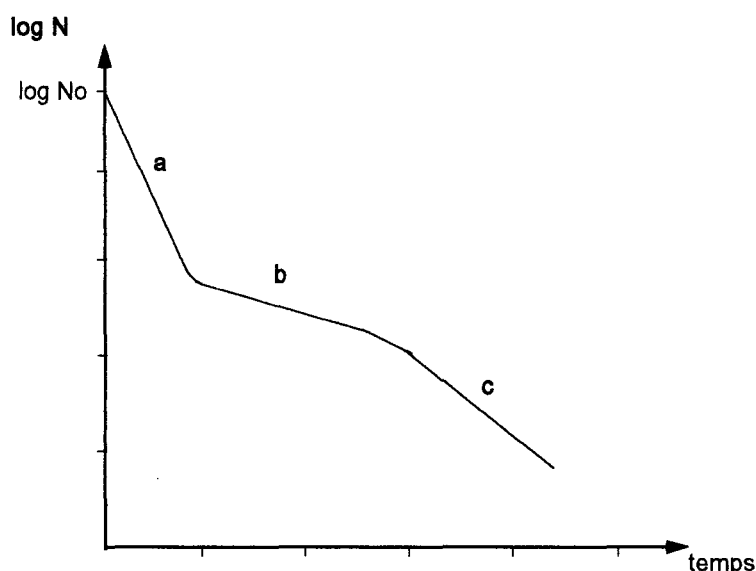
➤ - Délai dans l'établissement du traitement léthal (CERF et al. 1988) : si la diffusion de la température n'est pas homogène dans la suspension bactérienne, il n'y a pas de relation logarithmique entre le nombre de bactéries survivantes et la durée de traitement.

- Distorsions à cette loi constatées en début et / ou en fin de chauffage des spores (STUMBO, 1973; SENHAJI, 1973; CERF, 1977; MICHIELS et col., 1978; DRIADR, 1974; ETOA, 1983) : la plupart des spores ont besoin d'une activation pour germer et la chaleur est un excellent activateur, d'où une compétition possible entre la destruction des spores et leur germination.

➤ - Présence de deux populations génétiquement différentes ou plus : quand 2 espèces sont mélangées au sein d'une population, la courbe de survie est biphasique. La première partie de la courbe correspond à la destruction de l'espèce la plus thermosensible (BALL et OLSON, 1957; BOND et al., 1970; STUMBO, 1973; CERF, 1977).

- Formation d'amas en cours de traitement : d'après les travaux de STUMBO, 1973 la courbe est alors formée de plusieurs parties.

Figure I.5 : Courbe de survie obtenue lorsqu'il y a formation d'amas cellulaires pendant le traitement thermique (STUMBO, 1973).



- Hétérogénéité du traitement : ROBERTS et INGRAM (1965) ont observé que des spores chauffées dans des tubes ouverts immergés partiellement présentaient une courbe de survie concave. Celle-ci devient une droite quand les spores sont chauffées dans des ampoules scellées complètement immergées. ROBERTS et INGRAM expliquent ainsi le phénomène : les spores dans la partie supérieure de l'ampoule sont probablement soumises à des températures moins importantes que les spores emprisonnées dans la partie inférieure quand l'ampoule n'est pas complètement immergée, d'où la concavité observée.

- Apparition d'un effet protecteur du milieu au cours du traitement : quand les suspensions sont chauffées dans des aliments, de nombreuses réactions chimiques se produisent, modifiant ainsi l'environnement des bactéries. CERF et al., 1967, ont observé un effet protecteur du lait cuit sur les spores de *Clostridium butyricum*.

- Problème de la numération des survivants : la numération des survivants à des niveaux faibles (moins de 100 bactéries / g) est imprécise et source de nombreuses variations. La présence de traînées pourrait être liée à l'imprécision de la méthode de numération quand un nombre trop faible de dénombrements est effectué (CERF 1977).

- Augmentation de la résistance des micro-organismes en cours de traitement, qui pourrait être due à une mutation (BUSTA, 1967; HAN, 1975).

- Présence au sein de la population génétiquement homogène d'individus possédant différents degrés de thermorésistance. Cette variabilité serait physiologique et pourrait être notamment liée à l'âge des cellules (MOATS, 1971).

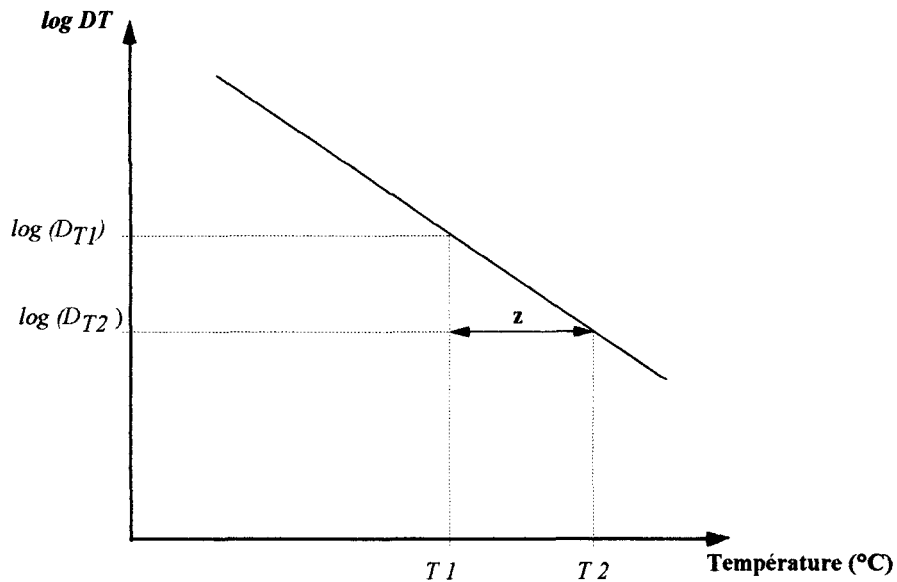
Même si des divergences existent, de nombreux auteurs (STUMBO, 1973; BALL et OLSON, 1957; CHEFTEL J.C. et CHEFTEL H., 1977) considèrent que l'allure logarithmique de la destruction thermique est suffisamment en accord avec la plupart des résultats expérimentaux pour pouvoir être tenue pour démontrée. Il est difficile de dire à l'heure actuelle si ces divergences résultent de phénomènes accessoires tels que l'activation des spores, la formation d'amas, l'hétérogénéité du traitement ou s'ils sont vraiment liés au mécanisme de la résistance. Seule la connaissance du mécanisme biochimique de la mort permettra de trancher la question (CHEFTEL J.C. et CHEFTEL H., 1977)

Lors de l'établissement des courbes de survie, afin de limiter les risques d'obtenir des courbes non linéaires, un certain nombre de précautions sont à prendre (CERF 1977). Il faut notamment s'assurer de l'homogénéité de la population bactérienne et de la température du traitement, éviter la formation d'amas cellulaires, laver les cellules avant traitement afin d'éliminer les débris cellulaires et les traces du milieu de culture, notamment si l'on réalise le choc dans un milieu différent, et réaliser de nombreuses mesures pour diminuer les risques d'erreurs de numération.

#### b. - Deuxième loi : Influence de la température

Dans le domaine des températures létales (supérieures à 65°C pour la plupart des bactéries) toute augmentation de température permet de diminuer le temps de réduction décimale  $D_T$ . Il est possible de faire varier la température et la durée d'un traitement thermique pour arriver au même effet, c'est à dire la destruction thermique des micro-organismes, et donc la stérilisation du milieu. L'expérience montre que la variation de  $D_T$  en fonction de la température  $T$  obéit à une loi du même type que celle de la variation de la population microbienne en fonction du temps. Ainsi, en portant le logarithme décimal de  $D_T$  en ordonnée et la température  $T$  en abscisse, on obtient généralement une droite (Figure I.6).

**Figure I.5** : Représentation de courbe de destruction thermique (Droite TDT)  
(Deuxième loi de destruction thermique des micro-organismes)



L'expression de cette droite est donnée par la relation suivante :

$$\log \left( \frac{D_{T_1}}{D_{T_2}} \right) = \frac{T_2 - T_1}{z} \quad (10)$$

d'où

$$D_{T_1} = D_{T_2} \cdot 10^{\frac{(T_2 - T_1)}{z}} \quad (11)$$

Si on remplace  $T_1$  par  $T_{réf}$  et  $T_2$  par  $T$  dans (11), on obtient :

$$D_{T_{réf}} = D_T \cdot 10^{\frac{(T - T_{réf})}{z}} \quad (12)$$

où  $D_{T_{réf}}$  est une valeur de référence à la température  $T_{réf}$

$T_{réf}$  est la température de référence à laquelle est définie la valeur pasteurisatrice.

Dans l'équation (12),  $z$  est le coefficient qui exprime l'augmentation de température nécessaire pour diminuer de dix fois la valeur  $D_T$ . Autrement dit,  $z$  représente numériquement le nombre de degrés Celsius nécessaires pour faire traverser un cycle logarithmique par la



droite. Cette loi, bien qu'empirique, est très souvent vérifiée, même quand les courbes de survie présentent des déviations par rapport à la première loi logarithmique (SENHAJI, 1973).

L'équation (12) montre que l'on peut calculer  $D_T$  à n'importe quelle température létale.  $D_T$  pouvant donc varier d'une température à l'autre, les comparaisons deviennent plus aisées grâce à l'adoption d'une température de référence de pasteurisation (formes végétatives), égale à 150° Fahrenheit soit 65°C (BIGELOW, 1921; BALL, 1923).

### c.- Notion de valeur pasteurisatrice

Les barèmes de cuisson / pasteurisation des plats cuits sous vide sont calculés selon le même principe que les barèmes de stérilisation.

La valeur  $P_{Tréf}^z$  (en minutes) est dite valeur pasteurisatrice minimale, nécessaire pour obtenir la pasteurisation pratique, c'est à dire le rapport ( $N/No$ ).

En multipliant les deux membres de l'équation (12) par le nombre  $n$  défini dans l'équation (9), on obtient la relation suivante :

$$nD_{Tréf} = nD_T \cdot 10^{\frac{(T-Tréf)}{z}} \quad (13)$$

En remplaçant  $D_T$  par  $t$ , on obtient l'expression :

$$P_{Tréf}^z = t \cdot 10^{\left(\frac{T-Tréf}{z}\right)} \quad (14)$$

Cette équation permet de calculer, d'après une valeur pasteurisatrice à une température déterminée prise comme base (par exemple 65°C), la durée d'un traitement thermique équivalent à toute autre température.

On retiendra que la thermorésistance d'une souche bactérienne en suspension dans un milieu de composition donnée est caractérisée par les paramètres  $D_{65}$  et  $z$ .

Les mêmes barèmes peuvent être calculés pour les formes sporulées, il s'agit dans ce cas d'une valeur stérilisatrice  $F_{121.1}^z$ .

## 2.- Facteurs affectant la thermorésistance des micro-organismes

Il est à souligner que la résistance des bactéries à la chaleur peut sensiblement varier selon plusieurs facteurs qui dépendent essentiellement de la composition chimique du milieu de suspension et de la température du traitement; les conditions de développement après traitement thermique ont également une influence (STUMBO 1973; HANSEN et RIEMAN, 1963; CHEFTEL J.C. et CHEFTEL H., 1977; SAINCLIVIER, 1988).

### a. - Résistance caractéristique des micro-organismes

La thermorésistance varie selon les espèces et peut également varier selon les souches d'une même espèce.

Les bactéries sporulées sont beaucoup plus résistantes que les formes végétatives, mais la réduction de la concentration en certains cations :  $\text{Fe}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  et  $\text{Ca}^{++}$ , en deçà d'un certain seuil dans le milieu de sporulation, diminue la thermorésistance des spores produites (SUGIYAMA, 1951; AMAHA et ORDAL, 1957; LEVINSON et HYATT, 1964; SADOFF, 1970, GOULD et DRING, 1975). D'autres éléments, tels les ions phosphates, abaisseraient la résistance des spores à la chaleur au cours de la sporogénèse (EL-BISI et ORDAL, 1956; RUSSEL, 1971).

La température de croissance et l'activité de l'eau ( $a_w$ ) du milieu influencent également l'acquisition de la thermorésistance. Les thermophiles sont plus résistants que les mésophiles et les psychrotrophes (ALLWOOD et RUSSEL, 1970; SAINCLIVIER, 1986). Ces différences pourraient s'expliquer par la présence de constituants plus stables à la chaleur chez les thermophiles que chez les psychrotrophes.

Les travaux de COOK et GILBERT, 1968, ont montré que des spores produites à 60°C ont une thermorésistance supérieure à celle déterminée chez les spores de la même souche mais qui ont été cultivées à 55°C.

Les travaux de PUROHIT et STACKES, 1967, ont montré que les bactéries psychrotrophes possédaient des enzymes plus thermosensibles que les bactéries mésophiles.

PACE et CAMPBELL, 1967, ont observé que les ribosomes d'un bon nombre de bactéries thermophiles étaient plus stables que ceux des bactéries mésophiles, car les bactéries thermophiles ont leurs optimum de croissance autour de 45°C, alors que les mésophiles ont leurs optimum de croissance entre 30°C et 40°C (BROCK et MADIGAN, 1988).

ROBISON et MORITA, 1966 (cités par ALLWOOD et RUSSEL, 1970) ont montré que la paroi cellulaire des bactéries psychrotrophes était très sensible à la chaleur humide. La structure de la paroi des bactéries Gram positif les rendrait plus thermorésistantes que les bactéries Gram négatif (ALLWOOD et RUSSEL, 1970), du fait que la paroi des bactéries Gram positif est constituée d'un nombre important de peptidoglycanes (GUNSALUS, 1979).

L'âge des cellules pourrait influencer la thermosensibilité des cellules. Certains auteurs ont en effet observé une corrélation entre l'âge et la thermorésistance des cellules végétatives : la thermorésistance est plus élevée pendant les phases de latence et les phases stationnaires et elle est plus faible pendant la phase logarithmique de croissance (HANSEN et RIEMAN, 1963; SAINCLIVIER, 1986).

## b. - pH

En général, à pH neutre, la thermorésistance est plus importante qu'à pH acide ou basique (STUMBO, 1973; HANSEN et RIEMAN, 1963). De plus, l'acidité du milieu de suspension serait en partie responsable des déviations de la loi logarithmique (CASOLARI et CAMPANINI, 1973).

Pour les filets et les charcuteries de poisson destinés à être cuits sous vide, le pH est généralement voisin de la neutralité en fabrication industrielle. Il peut être intéressant de diminuer le pH des produits de manière à modérer les traitements thermiques.

Le pH des plats participe aussi à la sélection des bactéries lors du traitement thermique: à pH inférieur à 4,5 peuvent se développer des moisissures et des bactéries anaérobies facultatives comme *Bacillus coagulans*, sans danger pour les consommateurs. Celles-ci résistent à des pH faibles, contrairement à la majorité des bactéries; leur résistance est maximale à un pH voisin de la neutralité et elle s'abaisse lorsque le pH diminue.

## c. - Activité de l'eau ( $a_w$ )

L'activité de l'eau influence également l'acquisition de la thermorésistance. La thermorésistance augmente avec la diminution de l'activité de l'eau. Une activité de l'eau réduite se traduit par une hydratation plus faible des protéines, ce qui a pour conséquence d'augmenter leur stabilité.

Il est acquis que la thermorésistance augmente de 10, voire de 100, lorsque le milieu est sec, donc à faible  $a_w$ . La thermorésistance des spores est maximale pour des valeurs d' $a_w$  voisines de 0,3 (CERF et al. 1988; ANGELOTTI, 1968; MURELL et SCOTT, 1966).

L'effet de l'abaissement de l' $a_w$  sur la thermorésistance des spores bactériennes est lui-même dépendant des types de solutés utilisés. Ainsi le chlorure de sodium, à même  $a_w$  que le glycérol du milieu de chauffage, augmente la valeur de  $D_{121.1}$  (SPILOTIS, 1983) alors que l'éthylène glycol diminue la thermorésistance des micro-organismes (CERF, 1977; HARNULV et al., 1977).

GIBSON, 1973 et HSIEH, 1976, ont constaté que la présence de concentrations élevées en sucres dans le milieu de traitement thermique augmente la thermorésistance de 4 micro-organismes (les Serovars senftenberg, et typhimurium de *Salmonella enterica*; *Saccharomyces rouxii* et *Torulopsis globosa*) pour des valeurs d' $a_w$  comprises entre 0,7 et 0,9.

Dans les préparations à base de produits de la mer, des valeurs d' $a_w$  élevées devraient faciliter la destruction des micro-organismes.

#### d.-Autres facteurs

D'autres effecteurs, tels les nitrites et autres agents chimiques, peuvent modifier la thermorésistance dans un sens comme dans l'autre, selon leur concentration dans le milieu. 0,3-0,5 pour 100 de NaCl peuvent favoriser la résistance à la chaleur alors que des concentrations élevées la diminuent (STUMBO, 1973).

Il est à souligner que les matières grasses ont un effet protecteur sur les micro-organismes. Il est bien établi que dans une huile complètement exempte d'eau, la thermorésistance est nettement plus élevée qu'en milieu aqueux (THUILLOT et al., 1968; SENHAJI et al, 1976). Dans les produits type charcuterie de poisson, les matières grasses sont émulsionnées et la taille des particules est telle que l'effet protecteur est très improbable (SENHAJI et al. 1976).

D'autres constituants peuvent avoir un effet sur la thermorésistance, c'est le cas de certaines épices qui diminueraient la thermorésistance des micro-organismes (ROZIER et al., 1985). Par contre les protéines auraient un effet protecteur (HANSEN et RIEMAN, 1963).

Il faut noter l'influence des conditions de croissance après les traitements thermiques : en effet, le nombre de micro-organismes survivants peut être différent selon la température d'incubation et le milieu de culture utilisé. BEUCHAT et LEUCHOWISH, 1968, ont obtenu un nombre maximal de survivants lorsque la température d'incubation était voisine de la température optimale de croissance.

MOATS, 1971; GRAVEN, 1983; DABBAH et al, 1971 ont obtenu des courbes de survie différentes selon les milieux de culture utilisés pour *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium*.

Dans les paragraphes précédents, on a décrit individuellement l'influence des paramètres physico-chimiques sur le développement microbien mais en fait, ces paramètres interagissent ensemble et, d'une façon générale, leur action est couplée à celle des micro-organismes eux-mêmes.

Au cours de la prolifération des micro-organismes, il y a modification de certains paramètres physico-chimiques de l'aliment (pH,  $a_w$ ...); les produits de métabolisme peuvent aussi agir comme des facteurs de croissance ou comme substances antimicrobiennes. On utilise aussi des bactéries lactiques, méthode biologique de préservation des aliments par la capacité de ces bactéries d'inhiber la flore d'altération (GILLIAN, 1975; HANNA, 1980).

Dans cette étude, on s'intéressera à l'effet des facteurs physico-chimiques, et principalement à l'effet combiné de la température et du pH sur la croissance des bactéries d'altération du poisson cuisiné sous vide. Beaucoup de travaux ont été effectués concernant les

effets des facteurs physico-chimiques sur la croissance microbienne. On peut citer l'effet combiné de l' $a_w$ , du pH et des températures sur la production de l'entérotoxine de *Staphylococcus aureus* (NOTERMANS et HENVELMAN, 1983).

Les bactéries d'altération ne sont pas toutes détruites aux températures inférieures à 65°C, mais leur développement nécessite de l'oxygène, qui est absent dans le sachet sous vide. Dans ce cas, le risque est directement lié à la qualité de l'emballage et à son imperméabilité aux gaz (CHAZAL, 1983, DIDOU, 1985).

Pasteuriser un aliment, c'est détruire en lui tous les micro-organismes pathogènes ou leur toxine et la majorité des bactéries d'altération tout en préservant au mieux ses caractéristiques physico-chimiques, organoleptiques et nutritionnelles. En pratique, la destruction totale est impossible. C'est donc un calcul de risque qu'il convient de faire : il s'agit de réduire suffisamment la flore bactérienne, compte tenu des aléas des conditions de conservation, de transport et d'utilisation, pour qu'elle ne compromette à aucun moment la salubrité du produit et, sur le plan commercial, qu'elle ne provoque pas de dégradation.

## BUTS DU TRAVAIL

L'utilisation des plats cuits sous vide à base de produits de la mer pouvant se conserver plusieurs semaines à basse température connaît un essor important. Cependant, les risques microbiologiques que présentent ces produits n'ont pas encore été suffisamment évalués.

En collaboration avec d'autres laboratoires de recherche de la région, ainsi qu'avec des entreprises de fabrication de plats cuisinés, l'Institut Agricole et Alimentaire de Lille (I.A.A.L.) a répondu en 1989 à un appel d'offre du Ministère de l'Agriculture et de la Forêt (Direction Générale de l'Alimentation) sur la qualité microbiologique des produits de la mer.

Les recherches présentées dans le présent travail concernent :

- le comportement de 6 bactéries témoins sélectionnées et isolées dans des plats cuisinés cuits sous vide;
- les conditions optimales de cuisson et de conservation, puis la détermination des valeurs pasteurisatrices minimales à appliquer pour détruire les bactéries de contamination dans ces aliments;
- l'influence du choc thermique sur les bactéries soumises à un traitement de pasteurisation et les modifications biologiques éventuelles.

*PARTIE II*  
**MATÉRIEL ET METHODES**

## ***PARTIE II***

### **MATERIEL ET METHODES**

---

Préalablement aux suivis de croissance, on a procédé à l'identification des bactéries les plus thermorésistantes. Cette identification a été réalisée à partir de colonies prélevées soit sur gelose Tryptose, soit sur gelose nutritive après culture de 24 heures à 37°C, et différentes galeries ont été utilisées pour l'identification des bactéries.

Par la suite, une cinétique de croissance pour toutes les bactéries a été effectuée en milieu Fish (poudre de poisson soluble) à des pH allant de 4,6 à 8,2 et à des températures variant de 2°C à 43°C (voir les caractéristiques du milieu Fish, I.4b).

Le biophotomètre (cf II.1) a permis de suivre la croissance des bactéries aux températures  $\geq 30^{\circ}\text{C}$ ; pour les températures  $< 30^{\circ}\text{C}$ , la culture a été effectuée dans des chambres tempérées sur table d'agitation. Les paramètres physicochimiques étudiés sont la température et le pH; les expérimentations sont faites en aérobiose et sous agitation. Le pH a été ajusté aux valeurs souhaitées par l'acide acétique normal ou la soude normale, le pH initial du milieu Fish étant de 5,9.

#### **I.- CULTURES BACTERIENNES**

On a utilisé pour ces études des bactéries isolées de produits de la mer. La sélection des plus thermorésistantes a été effectuée au Centre d'Expérimentation et de Valorisation des Produits de la Mer (C.E.V.P.M.) sur des suspensions de chair de lieu noir entier ou sur des filets qui ont été chauffés à 60°C pendant 15 et 60 minutes ou à 70°C pendant 10 et 20 minutes (MULAK. 1990).

##### **1.- Les souches étudiées**

Six souches ont été étudiées :

***-Enterococcus faecium***

***-Staphylococcus aureus***



*-Micrococcus varians*

*-Pseudomonas paucimobilis.*

*-Yersinia enterocolitica 1 & 2.*

Parmi les souches étudiées, deux souches ont été isolées comme étant *Yersinia enterocolitica*. Les tests concernant les caractéristiques biochimiques montrent que *Yersinia enterocolitica* 1 ne métabolise pas le melibiose alors que *Yersinia enterocolitica* 2 le métabolise. *Yersinia enterocolitica* 2 est mannitol lent .

## 2.- Procédé d'identification des bactéries

L'identification est réalisée à l'aide de galeries API, après quelques tests d'orientation :

- Examen microscopique à l'état frais
- Coloration de Gram
- Recherche de la catalase
- Recherche du cytochrome oxydase.

## 3.- Conservation des souches

Chaque souche est congelée en plusieurs exemplaires à -70°C, en rajoutant à un volume de culture bactérienne dense de 18 à 24 heures trois volumes de glycérol pur stérile. Cette méthode de conservation des souches dans le glycérol s'avère être la plus facile à réaliser. Elle permet de conserver un pourcentage de cellules viables important après plusieurs mois de stockage (BARBOUR et PRIEST, 1986 ).

## 4.- Milieux de culture (Annexe IV.1)

### a.- Milieux synthétiques

Milieu B.E.A., bile-esculine-azide (ISEMBERG et Col., 1970), de pH 7,2 (Milieu d'isolement et de dénombrement d'*Enterococcus faecium*).

Milieu Chapman-mannité (CHAPMAN, 1945), de pH = 7,5 (Milieu d'isolement et de dénombrement de *Staphylococcus aureus* et de *Micrococcus varians* )

Milieu PCA (Plate Count Agar) (A.P.H.A., 1967) (Milieu d'isolement et de dénombrement des aérobies totaux).

Milieu C.I.N (Cefsulodin-Irgrasan-Novobiocin) (SCHIEMANN, 1979).(Milieu d'isolement et de dénombrement de *Yersinia enterocolitica*).

Milieu Cetrimide Agar (BROWN and al., 1965) (milieu d'isolement et de dénombrement de *Pseudomonas*).

Milieu tryptose gélosé (culture de *Staphylococcus aureus* et d'*Enterococcus faecium*).

Bouillon nutritif (culture de *Yersinia enterocolitica*, de *Micrococcus varians* et de *Pseudomonas paucimobilis*).

#### b.- Milieu expérimental à base de poisson : milieu Fish

Préparé par la Coopérative de Traitement des Produits de la Pêche de BOULOGNE SUR MER (C.T.P.P.), il se présente sous forme atomisée et est préparé à partir de chair de poissons et de produits marins.

Il contient :

-une concentration en sels minéraux et en vitamines qui sont gardés par le poisson frais lors de sa conservation;

-des substances chimiques comme la triméthylamine (T.M.A.) (95 mg / 100g de produit brut) et l'oxyde de T.M.A. (68,5 mg / 100g de produit brut), qui n'apparaissent dans le poisson qu'à la suite d'une diffusion des micro-organismes de la surface vers l'intérieur de l'animal.

#### Caractéristiques du milieu Fish soluble (C.T.P.P.) :

##### Physiques

pH (à 10% dans l'eau)	5,9
Solubilité (à 50°C)	99,9 %
Viscosité	2400 m Pa.s
Densité	1160 Kg/m <sup>3</sup>

##### Chimiques

Matières sèches	65,0 %
Azote total	9,7 %
Azote aminé / Azote total	30,0 %
Azote basique volatil	0,2 %
Matières minérales	4,9 %
Matières grasses	1,0 %
Polysaccharides	0,0 %
Cellulose	0,0 %
A.aminés libres / A.aminés totaux	15,7 %

### Répartition des poids moléculaires de la fraction azotée

Entre 10000 et 15000	20 %
Inférieur à 10000	65 %
Acides aminés libres	15 %

### Vitamines (en ppm)

B1	4,60
B2	21,50
B6	2,40
B12	0,06
Niacine	70,00
Acide folique	0,82
Acide pantothénique	18,50

### Préparation du milieu Fish

Le milieu Fish soluble est utilisé à une concentration de 125 g / l (MALLE, 1992). Le milieu est ajusté aux pH: 4,6 - 5,0 - 5,5 - 6,0 - 6,4 - 7,2 - 8,2 avec l'acide acétique normal ou la soude normale.

On effectue une centrifugation pendant 20 min à 8000 g qui permet d'éliminer les substances insolubles puis, soit une filtration stérilisante sur des membranes de filtration dont la porosité est de 0,45 µm, soit une stérilisation de 30 min à 105°C.

Ce milieu riche convient à la culture des bactéries sélectionnées.

## **II.- LA CROISSANCE**

La croissance est suivie, d'une part en biophotomètre, d'autre part sur table d'agitation.

### 1.- Culture en biophotomètre

Les cultures en biophotomètre sont réalisées dans des tubes en verre (16 x 160) stériles contenant 5 ml du milieu à différentes températures et sous agitation.

Le biophotomètre S.L.E.L. 01V2 est un appareil qui permet de saisir automatiquement la densité optique à des intervalles de temps donnés, en vue d'établir les courbes de croissance. Ce prototype (MARAIS et al., 1981) contient un bain-marie à sec, constitué de deux blocs identiques, chaque bloc pouvant recevoir quatre tubes de cultures (Figure n° II.1), agités par un seul moteur (l'agitation est de type rotatif). Chaque bloc dispose de sa propre régulation de

de température, ce qui permet de travailler à 2 températures différentes. Devant chaque tube, une source de lumière monochromatique (longueur d'onde 600 nm) et un photodétecteur et son amplificateur sont montés face à face. La lumière captée par le photodétecteur est convertie en densité optique et est ensuite stockée en mémoire à l'intérieur du biophotomètre.

A la fin de la manipulation, les valeurs de la densité optique stockées dans la mémoire du biophotomètre, sont transférées sur disquette par ordinateur et les résultats sont traités par le logiciel Lotus 1.2.3.

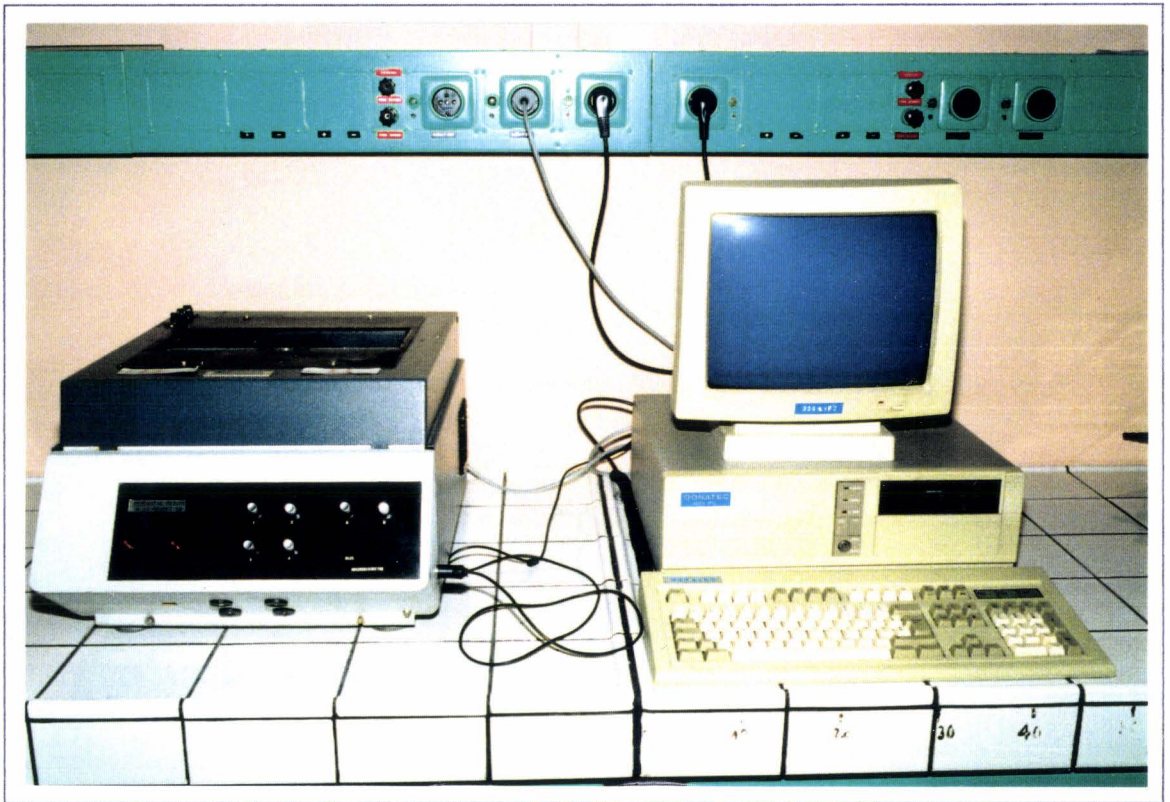


Figure n°II.1 : Photographie du biophotomètre S.L.E.L. 01V.  
(Société Lilloise d'Equipeement de Laboratoire)

On distingue à gauche le biophotomètre qui contient 2 blocs thermostatés et des boutons pour régler la température et l'agitation sur la face supérieure. En face : un afficheur à cristaux et des touches pour programmer le biophotomètre.

## 2.- Culture sur table d'agitation

Le biophotomètre ne permet pas de suivre des croissances à des températures inférieures à 30°C et par conséquent, cette partie de l'étude a été effectuée sur une table d'agitation dans des chambres tempérées, où l'on peut varier la température de 0 à 30°C.

## 3.- Mesure de la densité optique et comptage des bactéries

La croissance bactérienne est suivie en fonction du temps par mesure de la DO à 600 nm, soit au spectrophotomètre Zeiss, soit automatiquement par le biophotomètre.

La lecture s'effectue toutes les demi-heures pour les cultures incubées à des températures supérieures à 20°C, toutes les heures pour les cultures à 20°C, toutes les deux heures pour les cultures à 15°C, toutes les quatre heures pour les cultures à 7°C, tous les jours pour les cultures à 5°C et tous les trois à quatre jours pour les cultures à 2°C.

En parallèle avec les mesures de DO, le nombre de bactéries est estimé en réalisant des dilutions décimales des suspensions dans de l'eau physiologique (NaCl 1 %, autoclavage 20min à 120°C).

On utilise des boîtes de Petri dans lesquelles on ajoute 15ml de milieu Fish; les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48 heures. Le comptage des colonies permet d'établir une concordance entre la DO et la concentration en bactéries aux différents stades de croissance.

Le pH est mesuré en fin de croissance à l'aide d'un pHmètre. Par cette méthode, les optima de température à pH 7,2 seront recherchés pour chaque souche. Les températures testées sont 2, 5, 7, 11, 15, 20, 30, 37, 40 et 43°C. Les croissances à 2, 7 et 37°C seront analysées plus en détail.

## 4.- Préparation des cultures

### a.- Pré-cultures

Elles sont effectuées en tubes contenant 5ml de milieu Fish à pH 7,2 et inoculées, soit par 20µl d'une suspension bactérienne contenant environ  $2 \cdot 10^8$  bactéries / ml, soit par une colonie issue d'un isolement. L'incubation est réalisée sur table d'agitation horizontale à 120 saccades / min à 33°C.

### b.- Cultures

Elles sont effectuées en tubes contenant 5ml de milieu de culture et inoculées par  $10^6$  bactéries/ml d'une pré-culture en fin de phase exponentielle de croissance. L'incubation se fait à des températures déterminées, entre 2°C et 40°C, soit sur table d'agitation à 120 saccades/min, soit dans le biophotomètre (360 tours / min).

## 5.- Etude des facteurs limitant la croissance

### a.- Température

Des cultures ont été réalisées entre 2°C et 43°C, de manière à mettre en évidence l'influence de la température sur la croissance des bactéries.

### b.- pH

Une gamme de pH allant de 4,6 à 8,2 a été utilisée pour mettre en évidence l'influence du pH sur la croissance des bactéries.

Toutes ces manipulations ont été effectuées sous agitation:

- dans le biophotomètre (360 tours / min)
- ou sur la table d'agitation horizontale (120 saccades / min).

## 6.- Exploitation des résultats

L'exploitation des résultats de la croissance bactérienne a fait appel à des méthodes numériques. Etant donné le nombre élevé de mesures dans des conditions de culture différentes, un certain nombre d'erreurs involontaires peuvent se produire, surtout pour la détermination de la phase de latence, qui s'avère plus difficile dans une analyse directe des courbes de croissance, et encore plus pour des expérimentations à basses températures, où les prélèvements périodiques, allant de quelques heures à plusieurs jours selon la température, ne permettent pas de déterminer cette phase avec une précision suffisante. Pour obtenir une meilleure approximation des résultats, on a utilisé une méthode d'analyse numérique déjà utilisée par DUQUENOY, (1993), qui permet de tenir compte de toutes ces variations.

Tous les résultats sont traités par ordinateur à l'aide d'un programme graphique d'analyse numérique. Les pentes correspondant aux phases exponentielles de croissance sont données par une analyse de régression. Le coefficient de corrélation indiquant le degré de linéarité entre les points est automatiquement affiché pour chaque pente. Une valeur de 1 indique une linéarité parfaite.

La durée de la phase de latence est donnée à partir des courbes exprimant le log (concentration bactérienne) en fonction du temps. Les différents autres paramètres de croissance bactérienne sont obtenus à partir des mêmes graphiques.

L'évolution du pH a été mesurée pour chaque souche.

### **III.- ETUDE DE LA THERMORESISTANCE**

Etant donné le pH relativement élevé du poisson (6,1 à 6,9) et les pH retenus lors de la croissance bactérienne, on a choisi le pH 6,4 pour la suite des expériences de traitement thermique.

Le suivi de l'évolution du paramètre de résistance à la chaleur pour chaque bactérie est effectué au moyen de tubes TDT différents de par la nature du milieu de suspension : les uns contiennent des bactéries dans du tampon phosphate, les autres contiennent des suspensions dans du milieu Fish. C'est ce même milieu Fish, mais gélosé, qui a été utilisé après les chocs thermiques pour le dénombrement ou la revivification des bactéries.

Le dispositif utilisé pour ces expériences a été décrit par CHEFTEL et al., 1963, et utilisé par MULAK, 1990. Il consiste à immerger les tubes TDT contenant les bactéries dans un bain d'eau thermostaté à des températures comprises entre 54°C et 68°C avec une précision de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ , pendant des temps variables. Le chauffage des bactéries est arrêté en plongeant brutalement les tubes TDT dans un bain d'eau froide (0 à 4°C).

#### **1.- Préparation de la suspension**

Les suspensions mères sont réalisées de la manière suivante : les souches sont ensemencées sur un milieu Fish. Ces tubes contiennent un volume final de 5 ml et une suspension bactérienne au départ de  $10^6$  bactéries / ml. Ces tubes sont incubés 24 h à 30°C.

Après incubation, les bactéries sont récupérées par centrifugation (8 000 g pendant 18 minutes), puis lavées 2 fois dans 5 ml de tampon phosphate de pH 6,4. Le dernier culot est mis en suspension dans 5 ml de tampon phosphate. A partir de ces suspensions mères, conservées à 4°C, on effectue des dilutions idoines pour obtenir une valeur de  $N_0$  déterminée. Des vérifications en parallèle à la cellule de Thoma permettent de déterminer le nombre de bactéries par ml.

Avant les essais de traitement thermique, des essais préliminaires ont été effectués pour chaque souche et chaque milieu afin de délimiter les plages de températures à étudier; 3 températures au moins ont été étudiées.

Pour chaque température étudiée, on effectue 6 prélèvements échelonnés dans le temps, à raison de 2 tubes par prélèvement.

L'étude de la thermorésistance est effectuée dans le milieu Fish et dans du tampon phosphate pH 6,4 préparé en mélangeant x ml de phosphate monosodique (0,2 M) et y ml de phosphate disodique (0,2 M).

Le milieu de dénombrement est le milieu Fish gélosifié (12 g d'agar / l).

## 2.- Tubes TDT

Les tubes TDT sont obtenus à partir de tubes de verre borosilicaté, d'un diamètre extérieur de 10 mm et d'une épaisseur de 1 mm. Des tubes de 12 cm sont coupés, l'une des extrémités est fermée à la flamme. Les tubes sont ensuite stérilisés à l'autoclave.

## 3.-Protocole expérimental

Les bactéries sont placées dans deux milieux : tampon phosphate pH 6,4, et milieu Fish ajusté au pH 6,4. Le milieu Fish soluble reproduit les conditions nutritionnelles dans lesquelles les bactéries peuvent se retrouver dans un aliment, tandis que le tampon phosphate reconstitue un environnement non favorable à la multiplication bactérienne.

La suspension de bactéries estensemencée de manière à avoir  $10^6$  à  $10^7$  bactéries / ml. Après ensemencement, l'inoculum est réparti dans les tubes TDT stériles à raison de 1,5 ml / tube. Les tubes sont ensuite scellés à la flamme.

Dans les deux milieux, les bactéries subiront des traitements thermiques de durée variable.

## 4.- Régulation du bain d'eau chaude

Le bain-marie est muni d'une pompe de circulation d'eau et d'un régulateur de température; celle-ci est contrôlée par un thermomètre étalon de haute précision et un thermomètre à sonde silicium avec affichage électronique de la température à  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . L'inertie thermique du système tube-suspension des bactéries étant faible, l'échange calorique entre le bain d'eau et la suspension des bactéries est rapide. La température de la suspension de bactéries atteint en moins de 2 minutes la température du bain dans lequel le tube est plongé.

## 5.- Mesures des paramètres $D_T$ et $z$

La détermination des paramètres de thermorésistance  $D_T$  et  $z$  exige de réaliser des traitements thermiques à température strictement contrôlée au niveau des bactéries. On a choisi la méthode des tubes décrite par CHEFTEL et al. 1963, et utilisée par MULAK, 1990.

Après refroidissement, les tubes sont laissés environ 20 minutes à la température ambiante pour favoriser la croissance ultérieure des bactéries. Ils sont ensuite ouverts stérilement. La suspension est alors récupérée dans un tube à essai stérile. La suspension ou ses dilutions sontensemencées en milieu Fish solide, puis les boîtes de Pétri sont placées dans une étuve à  $37^\circ\text{C}$ . Les lectures sont effectuées après incubation pendant 48 à 72 heures au plus.



Pour calculer les paramètres de thermorésistance, nous avons utilisé le logiciel "Lotus 1.2.3". Le programme donne le coefficient de corrélation  $r$ , lequel indique le degré d'alignement des points sur la droite. La fonction "graphe" permet de tracer les droites de survie de  $\log N = f(t)$  et de  $\log D_T = f(T^\circ\text{C})$ . Les inverses de pente des courbes de survie et de TDT donnent respectivement le temps de réduction décimal  $D_T$  et le coefficient de température  $z$ .

#### 6.-Dénombrements

La plupart des dénombrements ont été effectués au bout de 48 heures. Cependant, sur quelques boîtes, on a pu observer une augmentation du nombre de colonies au-delà de 48 heures (72 h) : c'est ce nombre qui a été retenu. Le nombre de colonies est resté inchangé par la suite.

### **IV.- EVOLUTION DE LA CROISSANCE DES BACTÉRIES DANS DES FILETS DE POISSON APRÈS TRAITEMENT THERMIQUE**

Sur le plan réglementaire, lors d'une conservation permanente comprise entre  $0^\circ\text{C}$  et  $+3^\circ\text{C}$ , les produits doivent rester conformes aux critères microbiologiques définis par l'arrêté du 21 décembre 1979 pour les plats cuisinés à l'avance, jusqu'à 48 heures après la date limite de consommation (DLC),.

La matière première utilisée est le lieu noir en filets. Les filets ont été approvisionnés en un seul lot, en grande surface, sous forme congelée; pour chaque échantillon de lieu noir, une suspension de chair diluée au 1 / 5 est préparée. Cette suspension est utilisée pour l'étude de la microflore du poisson cru.

Les traitements thermiques sont effectués à  $60^\circ\text{C}$ , les prélèvements sont faits à intervalle de temps très courts, en fonction de la bactérie, et l'expérimentation est arrêtée pour des concentrations d'environ  $10^3$  à  $10^4$  bactéries / g.

Les suivis de développement des bactéries sont réalisés à  $+2^\circ\text{C}$  et  $+7^\circ\text{C}$ .

#### 1.- Analyse microbiologique

En ce qui concerne les prélèvements effectués pour les analyses microbiologiques des produits crus, la démarche est la suivante : 20 g de produit à analyser sont prélevés stérilement et déposés dans un pot de 400 ml stérile. 80 ml de diluant sont ajoutés de manière à obtenir une solution mère diluée au 1/5. Le broyage est ensuite effectué au broyeur Polytron.

## 2.- Protocole expérimental.

Des filets de 100 g sont décongelés stérilement dans une chambre froide à 2°C. Après décongélation, les filets sont broyés stérilement, puis le pH souhaité est ajusté, soit avec de la soude normale, soit avec de l'acide acétique normal. Le pH initial des filets est 6,43, deux autres pH sont sélectionnés pour cette étude : pH 6 et pH 7.

## 3.-Préparation de la suspension

On utilise le même protocole expérimental que celui décrit dans la partie II pour l'étude de la thermorésistance, mais au lieu de tubes TDT, on emploie des petits tubes à vis (10 x 95), pour pouvoir par la suite effectuer des prélèvements.

1,5 ± 0,1 g de produit broyé est réparti dans chaque tube stérile à l'aide d'une seringue, le volume de la suspension bactérienne est introduit à l'aide d'une pipette automatique, de façon à avoir environ 10<sup>6</sup> bactéries /g, puis la suspension est mélangée à la chair du poisson.

Les dénombrements sont effectués sur le milieu sélectif pour chaque bactérie.

## **V.- ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES PROTÉINES BACTERIENNES AVANT ET APRES TRAITEMENT THERMIQUE**

### 1.- Culture et préparation bactériennes

-450 ml de milieu Fish sont répartis dans des fioles de 1 litre pour être stérilisés à l'autoclave à 105°C pendant 30 min.

-L'ensemencement des fioles par 10<sup>6</sup> bactéries / ml est effectué dans des conditions stériles et les fioles sont mises sous agitation pendant 16 h.

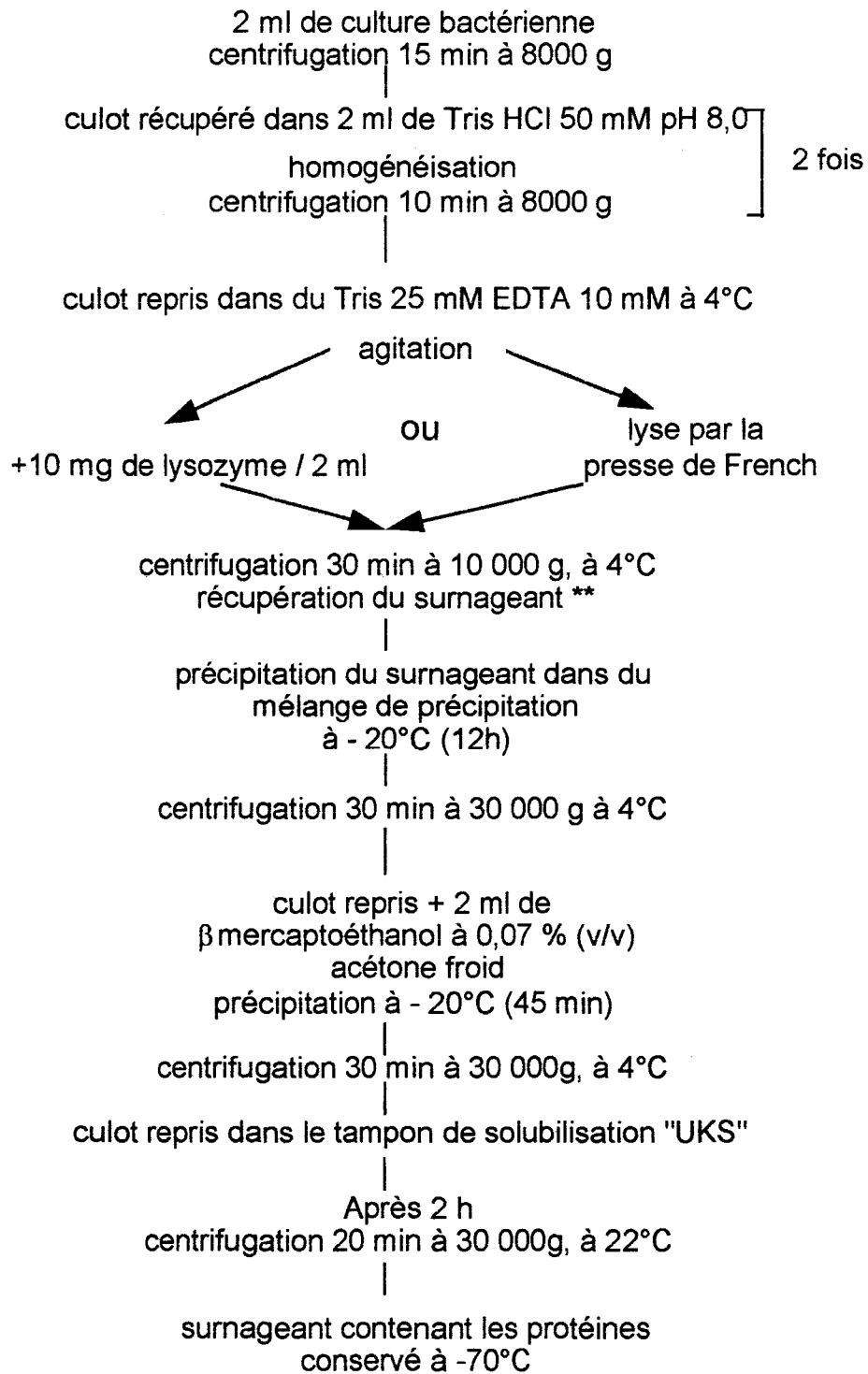
-Chaque culture est centrifugée pendant 20 min à 8000 g à 4°C.

-Le culot bactérien est récupéré dans un volume de 4 ml du milieu Fish et agité fortement pour avoir une suspension homogène.

-2 ml sont mis dans les tubes TDT et les tubes sont scellés à la flamme. Les 2 autres ml sont conservés à 4°C.

Les tubes sont ensuite complètement immergés dans un bain-marie pour subir un traitement thermique. La température de 60°C est choisie arbitrairement en tenant compte des résultats de l'étude de la thermorésistance des bactéries. Pour les bactéries les plus thermorésistantes, la durée du traitement a été allongée. Les traitements sont les suivants :

**Figure n° II.2 : Protocole d'extraction des protéines solubles totales**



\*\* contrôle de la concentration  
des protéines

- <i>Staphylococcus aureus</i>	: 10 min, à 60°C
- <i>Yersinia enterocolitica</i>	: 14 min, à 60°C
- <i>Micrococcus varians</i>	: 17 min, à 60°C
- <i>Enterococcus faecium</i>	: 20 min, à 60°C
- <i>Pseudomonas paucimobilis</i>	: 20 min, à 60°C.

Dès que le temps de chauffage est écoulé, les tubes sont sortis du bain et plongés immédiatement dans un bain d'eau froide (entre 0°C et + 4°C).

Pour éliminer le milieu Fish, plusieurs lavages sont effectués :

Les 2 ml de chaque suspension bactérienne sont alors centrifugés à 8000 g pendant 15 min. Chaque culot obtenu est resuspendu dans 2 ml Tris-HCl 50mM pH8,0 et agité pour avoir une suspension homogène. Une nouvelle centrifugation pendant 10 min à 8000 g est effectuée. L'opération est renouvelée 2 fois. La lyse bactérienne est effectuée ensuite selon deux procédés.

## 2. - Lyse bactérienne

La méthode de lyse d'un culot bactérien est inspirée de celle décrite par ANDERSON et McKAY (1983), modifiée pour les souches étudiées ici (figure II.2). Afin d'optimiser le protocole d'extraction des protéines totales, on a utilisé 2 procédés différents pour la lyse bactérienne. On a utilisé une lyse enzymatique par le lysozyme, et une action mécanique par la presse de French:

### a. - lyse par le lysozyme

Le lysozyme, enzyme extraite de l'oeuf, hydrolyse les peptidoglycanes composant la paroi des cellules bactériennes (MATHESON et McCLEARY, 1985). Le procédé est le suivant :

-Le culot bactérien est resuspendu dans 1 ml de Tris 25 mM, EDTA 10mM (T<sub>25</sub>E<sub>10</sub> pH8,0) et agité fortement pour avoir une suspension homogène.

-On ajoute ensuite 1 ml de lysozyme à 10 mg / ml, préparé dans le T<sub>25</sub>E<sub>10</sub> pH 8,0 et on incube 30 min au bain-marie à 37°C.

### b.- lyse par la presse de French

La lyse des bactéries Gram positif par le lysozyme est beaucoup plus difficile à obtenir: l'action du lysozyme est remplacée par l'action mécanique de la presse de French. Cette dernière favorise la rupture des parois bactériennes et permet la libération du contenu cellulaire.

-le culot bactérien est remis en solution dans 2 ml de T<sub>25E10</sub> pH 8,0 et mis à 4°C.

-Les bactéries sont alors lysées par deux passages en presse de French à 11000 psi (75845 kPa). La lyse cellulaire se traduit par l'obtention immédiate d'une solution visqueuse trouble homogène.

### c.- dosage des protéines

Les débris cellulaires et les bactéries non lysées sont éliminés par une centrifugation (10000 g, 30 min, 4°C), le surnageant est récupéré, la quantité totale de protéines est évaluée d'après la technique de LOWRY et al., 1951, PETERSON, 1979, modifiée selon FIÉVERT-DESREUMAUX (1980); ce dosage est effectué pour déterminer la quantité totale des protéines dans le surnageant.

## 3.-Extraction des protéines

### a.- précipitation des protéines

-On précipite les protéines (à -20°C, une nuit) par addition de 3 volumes du mélange de précipitation des protéines préconisé par ZIVY (1986) [acide trichloracétique (TCA) 10% (p/v), β-mercaptoéthanol 0,07 % (v/v) dans de l'acétone froid].

Au cours de cette étape, les protéines sont rapidement dénaturées; les extraits sont protégés de l'action des protéases et des oxydases.

-Après précipitation, l'extrait est centrifugé (30000 g, 30 min, 4°C). Pour éliminer l'excès de TCA, le surnageant est éliminé et le culot est repris dans 2 ml de β-mercaptoéthanol à 0,07 % (v/v) dans de l'acétone froid. Le culot est agité à l'aide d'un Vortex puis remis à précipiter à -20°C pendant 45 min.

### b.- solubilisation des protéines

-Une nouvelle centrifugation est réalisée dans les mêmes conditions, le culot renfermant les protéines est placé sous vide pour éliminer l'acétone. Ce culot est repris dans le tampon de solubilisation "UKS" (tableau n° 1 , Annexe IV.3 ) à raison de 20 à 40 µl / 100 à 150 µg de protéines.

-Après deux heures, une centrifugation (30000 g, 20 min, 22°C) permet d'avoir les protéines dans le surnageant. Elles sont alors conservées à -70 °C jusqu'à leur utilisation en électrophorèse.

#### 4.- Séparation des protéines par électrophorèse. (Electrophorèse bidimensionnelle)

La séparation des protéines se fait en deux étapes et selon deux paramètres indépendants:

- la charge électrique au cours de la première étape d'isoélectrofocalisation;
- la masse moléculaire au cours de la 2ème étape d'electrophorèse en gel SDS.

##### a.- Electrophorèse de première dimension ou isoélectrofocalisation (IEF)

###### - préparation du gel

Le gel de 1ère dimension contient des ampholines (molécules renfermant un nombre important de résidus polyamino-polycarboxyliques); l'application d'une tension de 1200 V est nécessaire pour permettre l'établissement d'un gradient de pH et la séparation des polypeptides jusqu'à leur point isoélectrique (pHi).

L'isoélectrofocalisation est réalisée en gels cylindriques de polyacrylamide (15 cm de longueur et 1,5 mm de diamètre). Les tubes sont placés dans un Becher contenant une solution d'acrylamide, dont la composition est donnée en Annexe IV.3 (tableau n° 2). La polymérisation du gel se fait sous l'action combinée de 20 µl d'ammonium persulfate (APS) à 10 % et de 14 µl de TEMED qui sont additionnés juste avant le remplissage par capillarité des tubes.

Après une heure de polymérisation, les tubes sont placés dans le support de la cuve supérieure du système de migration (cuve Protean Biorad). Au-dessus des gels est déposé le tampon de lyse (Annexe IV. 3, tableau n° 1 ). La partie supérieure de la cuve est alors remplie par NaOH 20 mM à la cathode, la solution est auparavant dégazée une demi-heure afin d'éliminer le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) qui pourrait nuire à la formation du gradient. La partie inférieure de la cuve est complétée par le tampon de migration pour l'anode (acide phosphorique 10 mM).

Une préfocalisation d'une heure est réalisée pour permettre l'établissement du gradient du pH dans le gel (3W, voltage à 1200 V), cette étape est très importante pour la réussite de l'électrophorèse bidimensionnelle.

###### - Electrophorèse

Après la préfocalisation, les échantillons protéiques sont déposés au dessus des gels (100 à 150 µg) ainsi que 1 à 2 µl de bleu de bromophénol qui permet de suivre le front de

migration. De plus, 2,5 µl d'un mélange de marqueurs de points isoélectriques connus (BDN, Poole, U.K.) est ajouté pour estimer le point isoélectrique des polypeptides et pour comparer de façon plus aisée les différents gels entre eux (Annex IV.3, Tableau n° 4).

L'isoélectrofocalisation proprement dite est effectuée pendant 17 heures à 1200 V (dans les mêmes conditions que la préfocalisation). On achève la séparation en soumettant les gels à une tension de 1500 V pendant 30 min.

Au cours de la focalisation isoélectrique, les polypeptides dénaturés par l'urée (qui agit sur les liaisons maintenant la structure tertiaire des protéines) ne migrent qu'en fonction de leur point isoélectrique et vont se stabiliser dans la région du gel où leurs charges nettes s'annulent.

Après la migration, les gels sont extraits des tubes par pression à l'aide d'une seringue remplie d'eau. Chaque gel est alors stocké à -70°C dans 500 µl du mélange d'équilibration préconisé par O'FARRELL (1975), modifié par HILBERT et al. 1988 [Tris-HCL 0,5 M pH 6,8 contenant du SDS à la concentration de 2,3 % et additionné de 50 µl d'une solution de bleu de bromophénol à 0,05 % (m/v)]. Ce dernier permettra d'apprécier la migration des protéines au cours de l'électrophorèse de 2ème dimension.

#### b.-Electrophorèse de 2ème dimension, en présence de SDS

Afin de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire, le sodium dodecyl sulfate (SDS) est utilisé. En effet, il se fixe sur les chaînes polypeptidiques des protéines et leur confère la même charge électrique.

L'électrophorèse de 2ème dimension est réalisée par groupe de 2 ou de 6 gels verticaux, en plaques de 18 x 16 x 0,1 cm.

Le gel de première dimension (IEF) est ramené à la température ambiante s'il est conservé; le mélange d'équilibration est éliminé. Le gel d'IEF est déposé au sommet d'un gel de séparation à 15 % dont la composition est donnée en Annexe IV. 3 (tableau n° 3); ce gel de séparation est obtenu après une polymérisation de 20 min. Les plaques sont alors fixées sur le support et l'ensemble est placé dans la cuve contenant le tampon de migration de LAEMMLI (1970) modifié par HOCHSTRASSER et al.(1988) : sa composition en g / l est la suivante : Tris 6 g; Glycine 28,8 g; SDS 1 g. Pour déterminer la masse des sous-unités protéiques, un mélange de 6 marqueurs protéiques, de masses connues, est déposé dans un puits du gel (Annexe IV.3 Tableau n° 5). Au cours de la migration, on commence avec un voltage de 250 V pendant 5 minutes puis à 350 V pendant 2 heures à 2,5 heures.

Quand le front de migration (bleu de bromophénol) est arrivé à l'extrémité de la plaque, les gels de deuxième dimension sont démoulés et placés au moins 1 heure dans 200 ml d'un mélange éthanol à 50 % et acide acétique à 12 % additionné de 100 µl de formaldéhyde. Ce

traitement permet la précipitation des protéines dans le gel, ce qui les rend insolubles. Il autorise également l'élimination de certains composés non protéiques qui pourraient interférer avec la coloration argentique.

#### 5.- Révélation des protéines

Les protéines sont révélées par coloration argentique, selon la méthode de BLUM et al. (1987) annexe IV.3 (tableau n° 6).

-Pour éviter la perturbation de la révélation, l'acide acétique est éliminé par 2 lavages de 30 min dans de l'éthanol à 50 % (v / v).

-Pour améliorer la sensibilité et le contraste de la coloration, on a effectué une immersion dans du thiosulfate de sodium (0,2 g / l) pendant une minute. Un lavage de 3 x 20 secondes à l'eau ultrapure permet ensuite d'éliminer le thiosulfate de la surface des gels avant leur imprégnation à l'argent.

-L'imprégnation argentique se fait durant 20 min dans 200 ml d'une solution de nitrate d'argent (2 g / l) contenant 150 µl de formaldéhyde 37 %. Ce dernier permet d'améliorer le contraste et la sensibilité de la coloration. A la fin, les complexes protéines-nitrates d'argent formés sont indissociables, contrairement à ceux formés entre l'argent et le gel de polyacrylamide.

-L'excès de nitrate d'argent est éliminé par 2 lavages de 20 secondes dans de l'eau ultrapure.

-La coloration est commencée par un faible volume (10 ml) du révélateur qui est constitué de carbonate de sodium (60 g / l), de formaldéhyde (0,5 ml d'une solution à 37 %) et de thiosulfate (4 mg / l). C'est une étape délicate, car la durée de la révélation est variable selon la coloration désirée, mais en général, dès l'apparition des premiers spots protéiques, la solution est éliminée et remplacée par 150 ml du même révélateur.

-La réaction est arrêtée par lavage à l'eau (1 min) des gels puis par immersion de ces derniers dans une solution d'éthanol à 50 % contenant de l'acide acétique à 12 % (v / v).

-Les gels peuvent être conservés à 4°C dans de l'éthanol à 50 % pendant plusieurs semaines avant séchage.

-Le séchage des gels se fait dans un bain de glycérol de 5 % (p/v) pendant 5 à 10 minutes, afin d'éviter qu'ils ne craquèlent lors du séchage. Ils sont ensuite disposés entre 2 feuilles de cellophane équilibrées de la même façon.

Après élimination des bulles d'air, les gels sont séchés 2 heures sous l'action conjuguée du vide et de la température, qui atteint 80°C (sécheur Boira, modèle 543).



## 6.- Lecture des gels

La détermination des masses moléculaires des sous-unités protéiques est effectuée grâce aux marqueurs de protéines, en calculant le Rapport Frontal (R.F.) qui correspond à la migration des marqueurs protéiques connus. Après la détermination des masses moléculaires des polypeptides, on a comparé pour chaque bactérie un gel échantillon avec un gel traité, en utilisant un lecteur de gel (Gel Reader "APELEX"). Dans les résultats, on donnera d'abord une analyse totale des gels. Seules 3 zones seront analysées en détail car elles présentent plus de différences. Des photos des gels en format normal seront données ainsi que des photos des zones étudiées prises en agrandissement.

# *PARTIE III*

## **RÉSULTATS ET COMMENTAIRES**

### *Chapitre 1*

#### **ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA CROISSANCE**

### *Chapitre 2*

#### **ÉTUDE DE LA THERMORÉSISTANCE**

### *Chapitre 3*

#### **ÉVOLUTION DE LA CROISSANCE DES BACTÉRIES DANS DES FILETS DE POISSON APRÈS TRAITEMENT THERMIQUE**

### *chapitre 4*

#### **ESSAIS PRÉLIMINAIRES EN VUE DE L'ÉTUDE DES PROTÉINES BACTÉRIENNES AVANT ET APRÈS TRAITEMENT THERMIQUE**

*Chapitre 1*

**ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA CROISSANCE**

## Chapitre 1

# ÉTUDE CINÉTIQUE DE LA CROISSANCE

---

La croissance des 6 bactéries retenues (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* 1, *Yersinia enterocolitica* 2, *Micrococcus varians* et *Pseudomonas paucimobilis*) a été réalisée en milieu Fish soluble. Deux objectifs ont été fixés :

- d'une part, pour la culture de ces bactéries en laboratoire, on a recherché pour chaque micro-organisme les optima de température à pH 7,2 dans les zones habituelles de croissance bactérienne (30°C, 37°C, 40°C et 43°C). En fonction des résultats obtenus, on a déterminé les caractéristiques de croissance pour chaque bactérie à 37°C, en analysant en détail la croissance aux pH 6 - 6,4 - 7,2 et 8,2.

- D'autre part, on a étudié le comportement de ces bactéries susceptibles d'être rencontrées dans les produits réfrigérés. Pour déterminer la durée de la phase de latence aux basses températures et les caractéristiques de la croissance, on a effectué des cultures aux températures de 2°C, 5°C et 7°C. Les cultures expérimentales à 2°C et 7°C seront analysées en détail car 2°C représente une température souhaitable pour la conservation des produits, tandis que 7°C peut correspondre à une rupture de la chaîne du froid des produits à conserver.

Dans tous les essais, la concentration bactérienne initiale est  $10^6$  bactéries / ml. Aux basses températures, la phase stationnaire est appréciée par l'identité des valeurs de mesure de quelques prélèvements consécutifs sur des cultures. La mesure du pH est effectuée en début et en fin d'expérimentation.

Les caractéristiques particulières de chaque courbe de croissance sont déterminées à l'aide du logiciel d'analyse numérique mis au point par LAURENT et DUQUENOY, 1993 : temps de latence ( $L_0$ ) et taux de croissance ( $\mu$ ) sont obtenus automatiquement; cette méthode permet en outre un lissage de la courbe si nécessaire.

Les caractéristiques des courbes de croissance analysées en détails (37°C, 7°C et 2°C) sont données sous forme de tableau résumé. On a noté les valeurs de pH mesurées au début et à la fin de l'expérimentation, ainsi que les caractéristiques des courbes de croissance en fonction du pH du milieu : le taux de croissance ( $\mu$ ) est exprimé en heure<sup>-1</sup> et le temps de latence ( $L_0$ ) est exprimé en heures ou en jours. On a également noté les coefficients de corrélation  $r$  et le logarithme de la concentration bactérienne en fin de phase exponentielle ( $\log N$ ). On a enfin établi des histogrammes tridimensionnels donnant les temps de latence en fonction de la température et du pH.

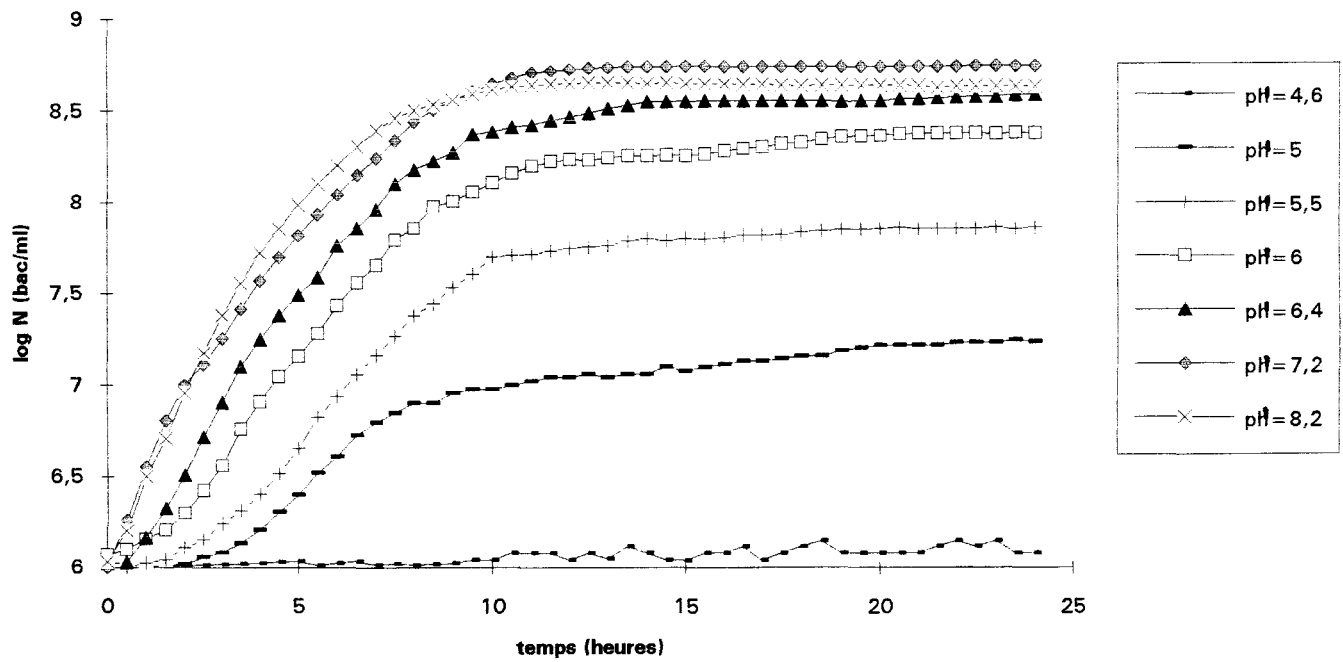


Figure n° III.1 : courbes de croissance d'*Enterococcus faecium* pour différents pH sous agitation à 37°C en milieu Fish.

## I.- RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES DE CROISSANCE EN LABORATOIRE DES BACTÉRIES SÉLECTIONNÉES

Pour cultiver en laboratoire, en condition normale de croissance, les 6 bactéries sélectionnées, on a réalisé des suivis de croissance en milieu Fish dans le biophotomètre, à pH 7,2 et à des températures situées entre 30 et 43°C; à titre d'exemple, on a précisé les caractéristiques de croissance à 37°C en fonction du p.

### 1.- *Enterococcus faecium*

#### a.- Conditions optimale de croissance à pH 7,2

Pour les températures étudiées (30°C, 37°C, 40°C et 43°C), on obtient des concentrations bactériennes finales supérieures à  $10^8$  bactéries / ml. Dans le milieu Fish, la température optimale de croissance se situe entre 37°C et 40°C, le taux de croissance est maximal à 40°C :  $(1,045 \pm 0,016) h^{-1}$  (tableau III.1). Cependant, à 37°C, la concentration bactérienne obtenue en phase stationnaire est maximale ( $5,5 \cdot 10^8$  bactéries / ml) et le temps de latence est le plus court (figure III.1). Dans des conditions normales, *Enterococcus faecium* est capable de se développer jusqu'à 45°C (MUNDT, 1986), avec une température de croissance optimale à 37°C (MOL, 1971).

Tableau n° III.1 : Croissance d'*Enterococcus faecium* entre 30°C et 43°C à pH 7,2.

Température (°C)	30	37	40	43
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	$0,338 \pm 0,009$	$0,709 \pm 0,011$	$1,045 \pm 0,016$	$0,243 \pm 0,012$
$\log N$ (bact. /ml)	8,73	8,74	8,68	8,51
temps en heures pour atteindre $N$	20	11	9	28

Les résultats obtenus concordent avec la bibliographie; cette température de 37°C est une température favorable pour la culture en laboratoire d'*Enterococcus faecium* dans les conditions expérimentales retenues.

### b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C

A cette température, on a étudié différentes cultures à des pH compris entre 4,6 et 8,2; on n'a pas noté de croissance à des pH inférieurs à 5 pour une période de 24 heures (figure III.1). Dans les conditions de l'expérimentation, l'optimum de croissance se situe entre pH 7,2 et 8,2. Entre pH 6 et 8,2 le taux de croissance baisse en même temps que le pH (tableau III.2). Le temps de latence est inférieur à 1 heure entre pH 6 et 8,2, il est par contre plus long pour des pH inférieurs à 6 et il est d'environ 2 heures à pH 5 (figure III.1). A la fin de la manipulation, les pH mesurés sont supérieurs aux pH initiaux, sauf pour le pH 8,2 où il ne varie pas.

Tableau n° III.2 : Cinétique de croissance d'*Enterococcus faecium* en milieu Fish, à 37°C, pendant 24 heures, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (h)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation r		
6	6,38	$0,331 \pm 0,002$	0,991	0,79	8,47
6,4	6,67	$0,511 \pm 0,010$	0,991	0,56	8,59
7,2	7,52	$0,709 \pm 0,011$	0,991	0,012	8,74
8,2	8,19	$0,745 \pm 0,009$	0,969	0,04	8,65

On n'a pas pu effectuer de cultures au delà de pH 8,2, étant donné qu'à des pH supérieurs, le milieu Fish précipite après stérilisation à 105°C. C'est pour cela que l'on a constaté une croissance effective uniquement aux pH compris entre 5 et 8,2, mais d'autres essais effectués à des pH de l'ordre de 9,2 en milieu tryptose montrent bien qu'*Enterococcus faecium* est capable de se développer dans des zones de pH alcalin pouvant aller jusqu'à pH 9,6 (FACKLAM et WILKINSON, 1981; LECLERC, 1989).

A 37°C, en milieu Fish, il est souhaitable de cultiver *Enterococcus faecium* entre pH 7,2 et 8,2.

## 2.- Staphylococcus aureus

### a.- Conditions optimales de croissance à pH 7,2

Dans cette étude, la température optimale de croissance se situe entre 37°C et 40°C; le taux de croissance le plus élevé a été trouvé à 40°C ( $1,43 \pm 0,007$ )  $h^{-1}$  et le plus bas est à 30°C ( $0,298 \pm 0,002$ )  $h^{-1}$ . A 37°C, on obtient la concentration maximale en 24 heures ( $7,6.10^8$  bactéries / ml). Elle atteint pour le même pH  $6,2.10^8$  bactéries / ml à 40°C (tableau III.3).



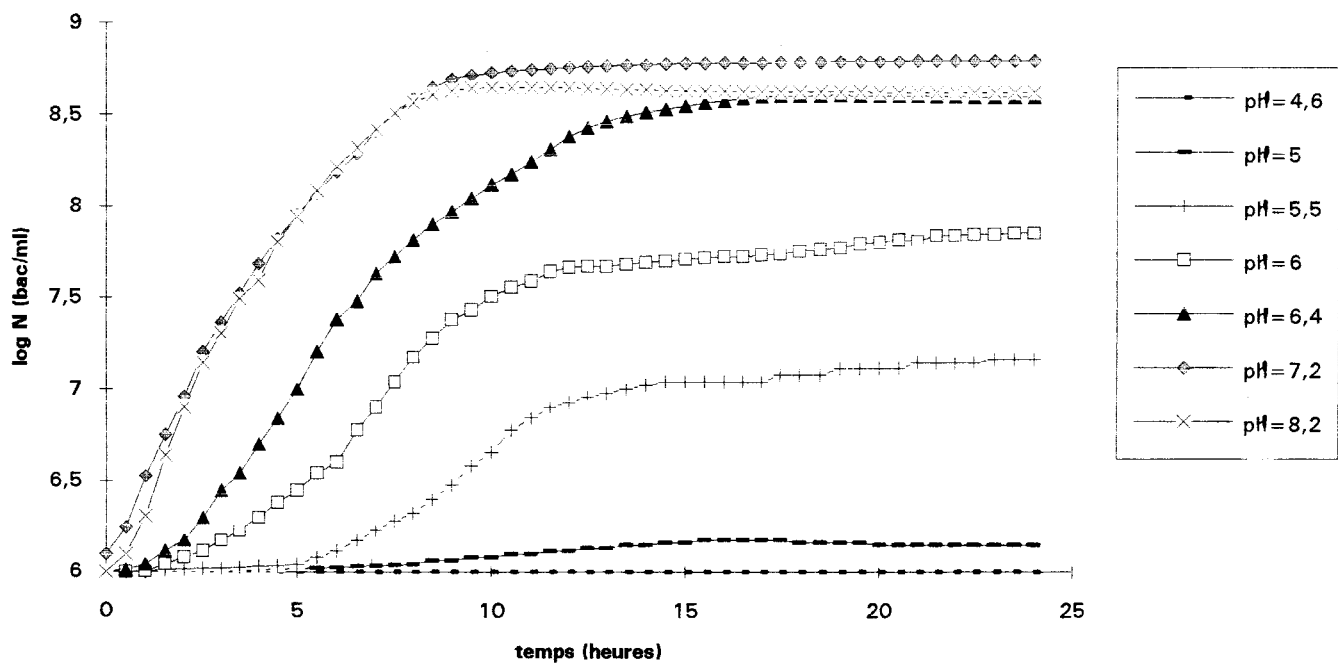


Figure n° III.2 : courbes de croissance de *Staphylococcus aureus* pour différents pH sous agitation à 37°C en milieu Fish.

*Staphylococcus aureus* est capable de se développer jusqu'à des températures limites de 46°C (HURST et al., 1983). PEREIRA, 1982, a déterminé avec précision la température optimale de croissance de *Staphylococcus aureus*, elle est égale à 39,4°C.

Tableau n° III.3 : Croissance de *Staphylococcus aureus* entre 30 et 43°C à pH 7,2.

Température (°C)	30	37	40	43
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	0,298 ± 0,002	0,971 ± 0,011	1,429 ± 0,007	0,377 ± 0,010
$\log N$ (bact. /ml)	8,83	8,88	8,78	8,58
temps en heures pour atteindre $N$	19	10	8	16

37°C semble être une température convenable pour la culture de *Staphylococcus aureus* en laboratoire, puisque l'on a obtenu la concentration maximale dans cette zone de température.

b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C

A 37°C, en milieu Fish, l'optimum de croissance est situé entre pH 7,2-8,2; la croissance est faible en dessous de pH 6 et elle est quasiment nulle à pH 4,6 pour une période de 24 heures (Figure III. 2). C'est à pH 7,2 que la concentration bactérienne finale est maximale ( $7,6.10^8$  bactéries / ml ) et que le temps de latence est nul (Tableau III.4). Les travaux de MAGRINI et al., 1983, montrent que *Staphylococcus aureus* résiste à des pH jusqu'à 4,2, mais avec une forte réduction de la croissance. JAY, 1986, et CARLIER, 1983, ont rapporté dans leurs travaux qu'on peut rencontrer *Staphylococcus aureus* à des pH extrêmes, jusqu'à 4,2 et 9,3, mais avec un optimum de croissance situé entre 6,8 et 7,5.

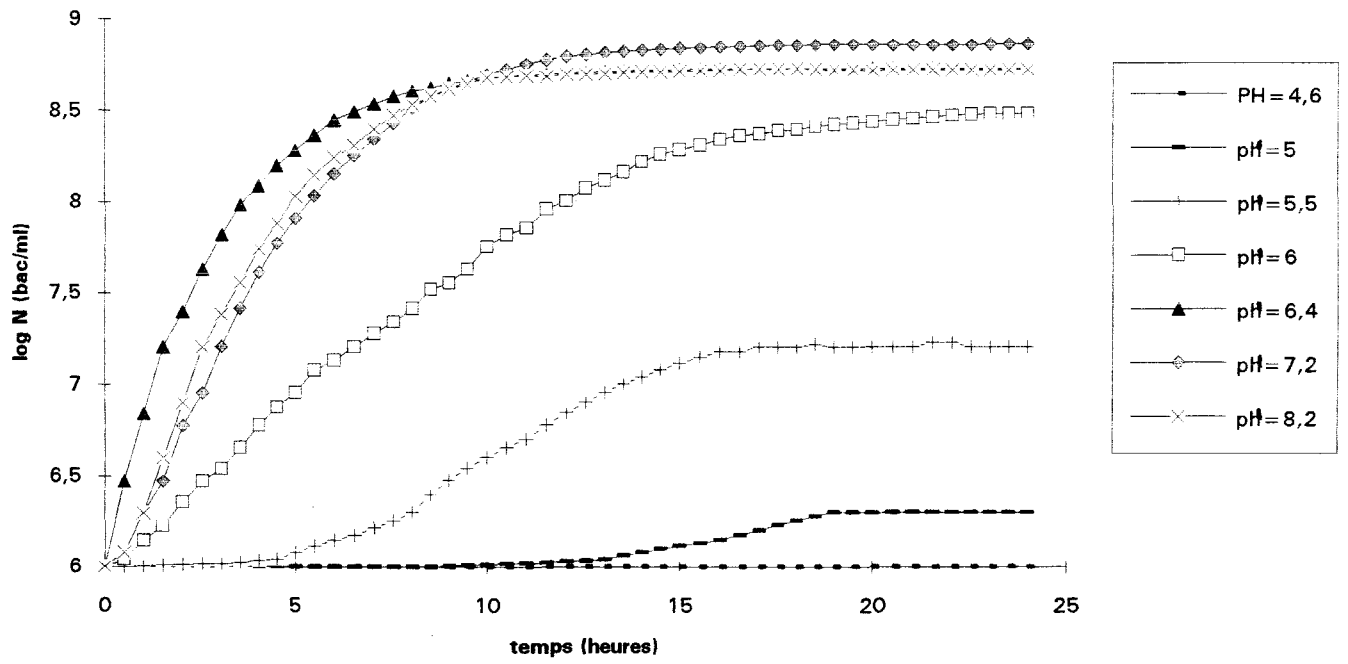


Figure n° III.3 : courbes de croissance de *Yersinia enterocolitica* 1 pour différents pH sous agitation à 37°C en milieu Fish.



Tableau n° III.4 : Résultats de l'étude cinétique de *Staphylococcus aureus* en milieu Fish, à 37°C, pendant 24 heures, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (h)	log N (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,25	0,184 ± 0,010	0,998	1,71	7,64
6,4	6,53	0,438 ± 0,011	0,980	0,61	8,58
7,2	7,51	0,971 ± 0,011	0,978	0,001	8,88
8,2	8,21	1,310 ± 0,009	0,986	0,44	8,61

Si le temps de latence est pratiquement inexistant à pH 7,2, il augmente avec la baisse du pH pour atteindre 5 heures à pH 5,5 (figure III.2). Le pH mesuré en fin d'expérimentation est supérieur au pH initial pour toute la gamme de pH étudiée.

La croissance de cette bactérie en laboratoire peut donc être réalisée sur milieu Fish à 37°C et à pH 7,2.

### 3.- *Yersinia enterocolitica* 1

#### a.- Conditions optimales de croissance à pH 7,2

Dans cette étude, on a trouvé que la température optimale de croissance se situe à 37°C. Au pH 7,2, la concentration bactérienne finale est maximale ( $7,1 \cdot 10^8$  bactéries / ml après 24 heures de culture). Le taux de croissance le plus élevé est à 37°C et le taux le plus bas est rencontré à 30°C et 43°C (tableau III.5). Les pH mesurés en fin d'expérience augmentent. OREFICE et al., 1989, ont mis en évidence que *Yersinia enterocolitica* est capable de se développer jusqu'à 42°C et que l'optimum de croissance se situe entre 28°C et 30°C.

Par la suite, la température de 37°C a été sélectionnée pour la culture de cette bactérie.

Tableau n° III.5 : Croissance de *Yersinia enterocolitica* 1 entre 30 et 43°C à pH 7,2.

Température (°C)	30	37	40	43
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	0,309 ± 0,002	0,996 ± 0,020	0,590 ± 0,005	0,306 ± 0,010
$\log N$ (bact. /ml)	8,81	8,85	8,84	8,54
temps en heures pour atteindre $N$	21	12	15	20

b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C

A 37°C, il y a absence de toute croissance en-dessous du pH 5. *Yersinia enterocolitica* 1 présente l'optimum de croissance à pH 7,2. Entre les pH 6 et 8,2 le temps de latence est plus court (inférieur à 1 heure) alors qu'il est plus long à des pH inférieurs à 6 et qu'il atteint 5 heures à pH 5,5 (Figure III.3).

Tableau III.6 : Résultats de l'étude cinétique de *Yersinia enterocolitica* 1 en milieu Fish, à 37°C, pendant 24 heures, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (h)	$\log N$ (bact.s /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,49	0,390 ± 0,003	0,990	0,59	8,39
6,4	6,60	0,779 ± 0,034	0,968	0,001	8,73
7,2	7,49	0,996 ± 0,020	0,990	0,18	8,85
8,2	8,30	0,744 ± 0,020	0,963	0,61	8,72

En milieu Fish, à pH 7,2, le taux de croissance est élevé, il est de  $(0,996 \pm 0,02) h^{-1}$ , la population bactérienne est maximale ( $7,1 \cdot 10^8$  bactéries / ml) (Tableau III.6). ABER et al., 1989, rapportent dans leurs travaux que *Yersinia enterocolitica* est capable de se multiplier entre pH 5 et 9 avec un optimum à 7-8.

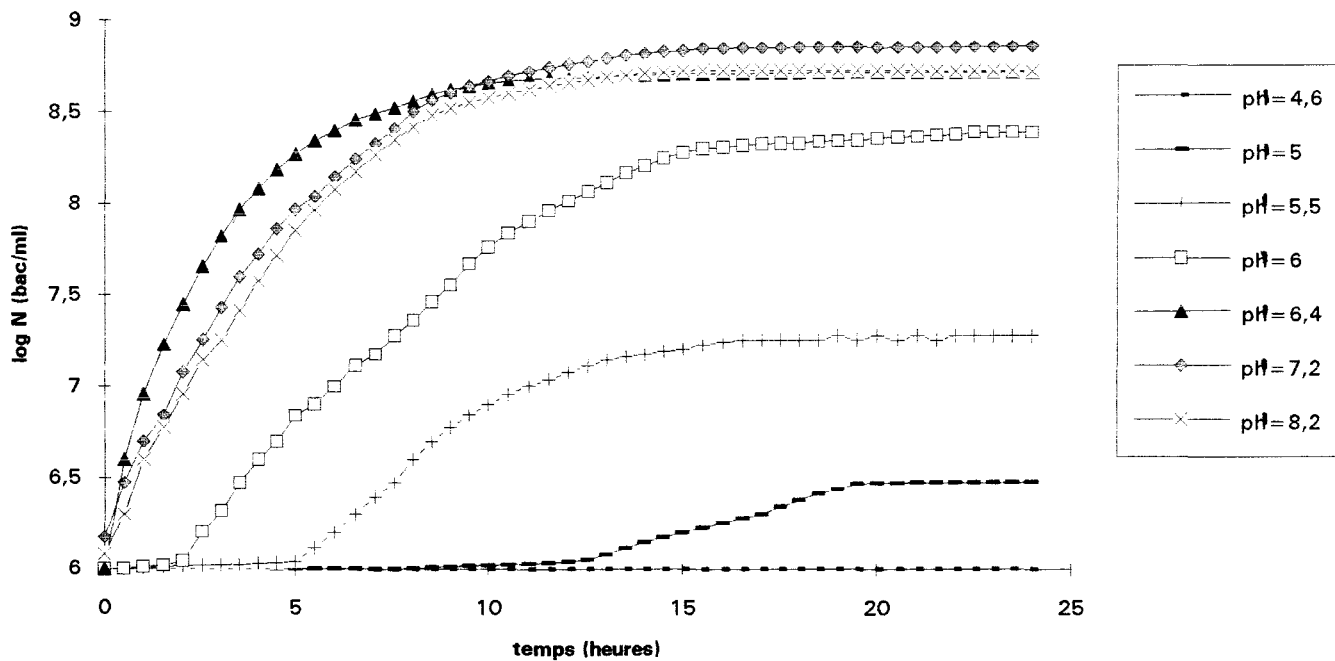


Figure n° III.4 : courbes de croissance de *Yersinia enterocolitica* 2 pour différents pH sous agitation à 37°C en milieu Fish.

Pour cette bactérie, au laboratoire, la température de 37°C sera utilisée par la suite pour la culture dans le milieu Fish.

#### 4. *Yersinia enterocolitica* 2

##### a.- Conditions optimale de croissance à pH 7,2

*Yersinia enterocolitica* 2 se développe jusqu'à 43°C; la concentration bactérienne finale dénombrée est toujours supérieure à  $10^8$  bactéries / ml. A pH 7,2, cette concentration est maximale en fin de croissance, elle est de l'ordre de  $8,9 \cdot 10^8$  bactéries / ml (Tableau III.7). La zone optimale de croissance se situe entre 37°C et 40°C, et l'on a obtenu la même zone optimale de croissance que pour *Yersinia enterocolitica* 1. Par contre, OREFICE et al., 1989, ont déterminé une zone d'optimum de croissance beaucoup plus faible que ces valeurs expérimentales obtenues, elle se situe entre 28°C et 30°C, mais ils ont également montré que cette bactérie peut se développer jusqu'à 42°C.

Tableau n° III.7 : Croissance de *Yersinia enterocolitica* 2 entre 30 et 43°C à pH 7,2.

Température (°C)	30	37	40	43
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	$0,434 \pm 0,004$	$0,611 \pm 0,005$	$0,715 \pm 0,006$	$0,297 \pm 0,009$
$\log N$ (bact. /ml)	8,91	8,95	8,84	8,55
temps en heures pour atteindre $N$	20	12	14	26

Les souches de *Yersinia enterocolitica* sélectionnées pour cette étude se multiplient convenablement autour de 37°C. Le nombre de *Yersinia enterocolitica* rencontrés dans la nature est très important; le comportement de ces 2 souches est à prendre en considération car il n'est pas impossible qu'il existe d'autres souches capables de se multiplier dans ces zones de températures en milieu Fish. Il semblerait que l'on aie des souches bien adaptées à cette température de 37°C.

##### b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C

Entre pH 4,6 et 8,2, aucune croissance significative n'a été détectée en dessous de pH 5 pour une période de 24 heures. A pH 4,6, la concentration bactérienne reste inchangée en fin d'expérimentation. Entre pH 6,4 et pH 7,2, le temps de latence est nul, par contre il augmente avec la baisse du pH pour atteindre 12 heures à pH 5 (Figure III.4). C'est à pH 7,2 que la

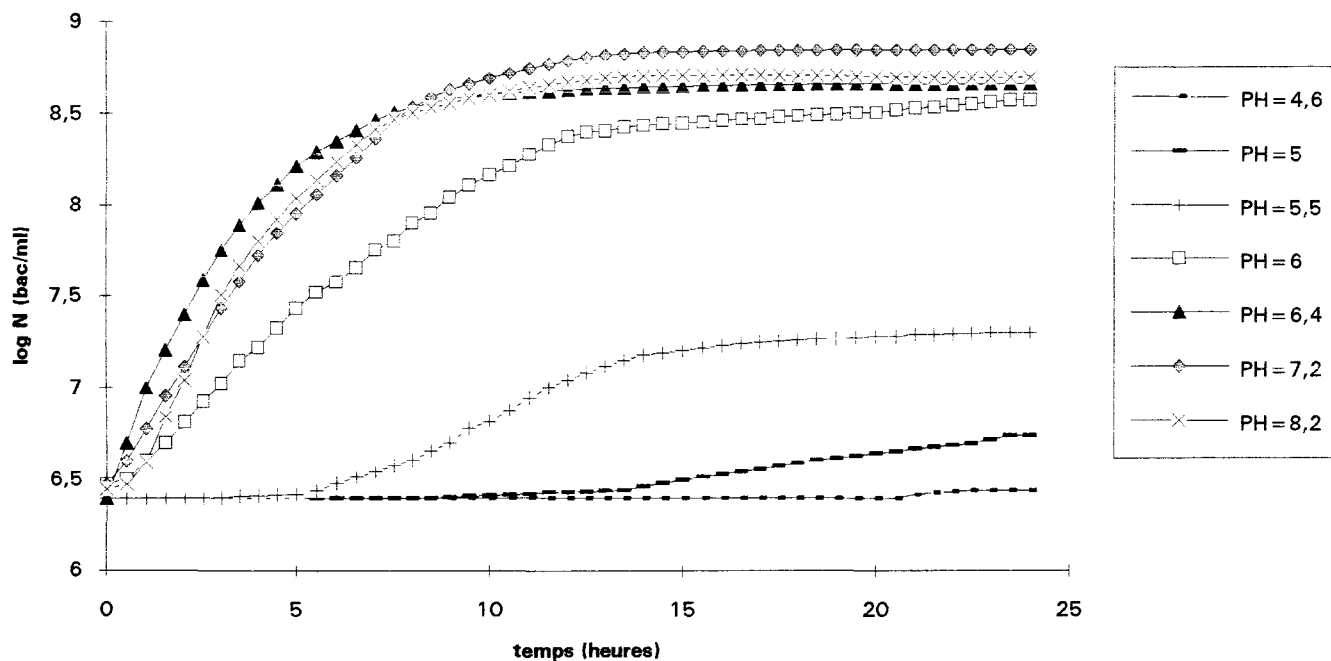


Figure n° III.5 : courbes de croissance de *Micrococcus varians* pour différents pH sous agitation à 37°C en milieu Fish.





concentration bactérienne finale est maximale ( $8,9 \cdot 10^8$  bactéries / ml), mais c'est à pH 6,4 que le taux de croissance est le plus élevé ( $0,971 \pm 0,007$ ) h<sup>-1</sup> (Tableau III.8).

**Tableau n° III.8** : Cinétique de croissance de *Yersinia enterocolitica* 2 en milieu Fish, à 37°C, pendant 24 heures, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (h)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,39	$0,252 \pm 0,002$	0,994	1,39	8,40
6,4	6,57	$0,971 \pm 0,007$	0,974	0,001	8,71
7,2	7,45	$0,611 \pm 0,006$	0,986	0,001	8,95
8,2	8,19	$0,538 \pm 0,007$	0,987	0,13	8,72

*Yersinia enterocolitica* résiste à des pH jusqu'à 4,6, sans réduction de la croissance, mais avec un optimum dans la zone allant de pH 6,4 à pH 7,2. La température de 37°C est sélectionnée pour la culture en milieu Fish de cette bactérie en laboratoire.

## **5.- *Micrococcus varians***

### **a.- Conditions optimales de croissance à pH 7,2**

*Micrococcus varians* se développe entre 30°C et 43°C, la température optimale de croissance se situe vers 37°C. La concentration bactérienne maximale obtenue en fin de croissance est de  $6,9 \cdot 10^8$  bactéries / ml à 37°C. On obtient la même concentration bactérienne finale à 30°C, mais avec un taux de croissance moins important (tableau III.9). SCHLEIFER et al., 1981, ont observé que *Micrococcus varians* a un optimum situé entre 25°C et 37°C.

La température de 37°C peut être une température convenable pour la culture en milieu Fish de *Micrococcus varians* en laboratoire.

Tableau n° III.9 : Croissance de *Micrococcus varians* entre 30 et 43°C à pH 7,2.

Température (°C)	30	37	40	43
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	0,429 ± 0,004	0,928 ± 0,008	0,747 ± 0,004	0,312 ± 0,005
$\log N$ (bact. /ml)	8,84	8,84	8,73	8,43
temps en heures pour atteindre $N$	21	12	14	26

b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C

A pH 7,2, la concentration bactérienne maximale est de  $6,9 \cdot 10^8$  bactéries / ml, mais l'optimum de croissance se situe dans la zone de pH 6,4-8,2. Le taux de croissance baisse à partir du pH 6; en dessous de pH 5,5, la croissance est ralentie, voire absente à pH 4,6 (Figure III.5). Dans la zone de pH 6-8,2, le temps de latence est faible, mais ce dernier est plus long avec la baisse du pH pour atteindre 5 heures à pH 5,5.

37°C est effectivement une température convenable, à retenir pour la culture en milieu Fish de cette bactérie en laboratoire.

Tableau n° III.10 : Cinétique de croissance de *Micrococcus varians* en milieu Fish, à 37°C, pendant 24 heures, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (h)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,26	0,305 ± 0,003	0,992	0,38	8,57
6,4	6,58	0,961 ± 0,025	0,976	0,001	8,65
7,2	7,47	0,928 ± 0,010	0,989	0,19	8,84
8,2	8,29	0,933 ± 0,020	0,961	0,44	8,71

6.- *Pseudomonas paucimobilis*

a.- Conditions optimale de croissance à pH 7,2

C'est à 37°C que l'on constate une croissance optimale de *Pseudomonas paucimobilis*. A 37°C, la concentration bactérienne maximale est égale à  $10^9$  bactéries / ml, et l'on a le taux de croissance le plus élevé ( $1,23 \pm 0,010$ )  $h^{-1}$ . Les travaux de ENFORS et al., 1979, montrent

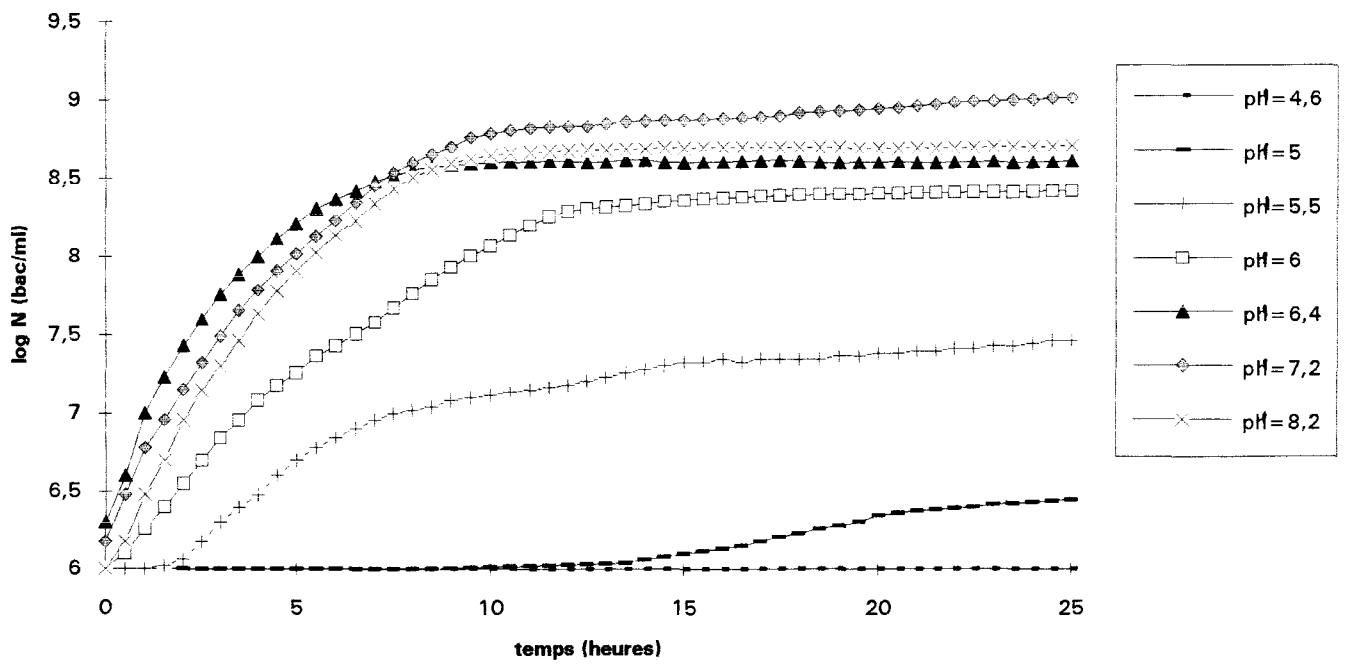


Figure n° III.6 : courbes de croissance de *Pseudomonas paucimobilis* pour différents pH sous agitation à 37°C en milieu Fish.

bien que les *Pseudomonas* sont capables de se développer jusqu'à 43°C. Il faut toutefois remarquer que d'après le BERGEY'S Manual, *Pseudomonas paucimobilis* ne peut pas être cultivé à 42°C.

Tableau n° III.11 : Croissance de *Pseudomonas paucimobilis* entre 30 et 43°C, à pH 7,2.

Température (°C)	30	37	40	43
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	0,755 ± 0,001	1,257 ± 0,010	0,966 ± 0,011	0,289 ± 0,010
$\log N$ (bact. /ml)	8,78	9,00	8,72	8,56
temps en heures pour atteindre $N$	24	11	14	28

b.- Exemple : détermination des caractéristiques de croissance à 37°C

A pH 7,2, on obtient la concentration bactérienne maximale de  $1.10^9$  bactéries / ml et un taux de croissance de  $(1,257 \pm 0,010) h^{-1}$ . A pH 6,4, on a le même taux de croissance, mais la population bactérienne finale est de 60 % inférieure (Tableau III.12).

Le temps de latence est nul dans la zone de pH 6,4-8,2, mais il s'allonge en dessous de pH 6 pour atteindre 2 heures à pH 5,5 (figure III.6)

Tableau n° III.12 : Résultats de l'étude cinétique de *Pseudomonas paucimobilis* en milieu Fish, à 37°C, pendant 24 heures, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (h)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,29	0,510 ± 0,004	0,992	0,33	8,41
6,4	6,74	1,257 ± 0,011	0,987	0,001	8,60
7,2	7,61	1,257 ± 0,010	0,978	0,001	9,00
8,2	8,28	0,742 ± 0,007	0,990	0,001	8,70

On constate que le pH de la culture augmente au cours de la croissance. On sait que les *Pseudomonas* sont parmi les premières bactéries responsables de la formation de métabolites et surtout d'ammoniac, qui provoque l'augmentation du pH et l'apparition de mauvaises odeurs (Travaux de VAN SPREEKENS, 1977, cités par LISTON, 1980).

## 7.- Commentaires et conclusion

Pour la précision des mesures, on a déterminé la valeur moyenne des coefficients de corrélation ( $0,983 \pm 0,009$ ), avec la valeur de probabilité  $p = 0,05$  pour les cultures incubées à des températures supérieures ou égales à  $30^{\circ}\text{C}$ . La validité de ces coefficients est toujours estimée supérieure ou égale à  $0,96$ .

Dans les conditions habituelles de conservation industrielle, les plats préparés sont en principe stockés en position statique; toutes les cultures ont été effectuées sous agitation, de manière à provoquer une croissance maximale des bactéries. On a ainsi établi une marge de sécurité pour la conservation.

Le pH mesuré en fin de culture est sensiblement plus élevé que le pH initial, ce qui peut s'expliquer par le fait que le milieu Fish contient des fractions azotées et qu'au cours de la croissance, ces dernières vont être dégradées par les bactéries pour donner des amines diverses et du  $\text{NH}_3$ , entraînant une augmentation du pH (RAGUENES, 1988).

Entre  $30$  et  $43^{\circ}\text{C}$ , l'ensemble des souches bactériennes étudiées se multiplient pour des pH compris entre  $5$  et  $8,2$ ; à des pH voisins de  $4,6$ , il y a absence totale de croissance en milieu Fish. On note cependant qu'à ce pH, ces bactéries résistent, puisque la concentration bactérienne finale reste de l'ordre de  $10^6$  bactéries / ml. La comparaison de l'évolution de la croissance des micro-organismes en fonction des différents pH de culture montre que l'allongement de la phase de latence est observé à des pH inférieurs à  $6$ .

Cette étude préliminaire a permis de déterminer les conditions de culture de ces bactéries en laboratoire : tous les micro-organismes ont un optimum autour de  $37^{\circ}\text{C}$ . A cette température, leur taux de croissance est optimal. Il s'agit bien ici de bactéries mésophiles, qui sont des bactéries capables de se multiplier à des températures allant de  $20^{\circ}\text{C}$  à  $45^{\circ}\text{C}$ , avec un optimum à  $37^{\circ}\text{C}$  (MESCLE et ZUCCA, 1988). Par la suite, on a choisi la température de  $37^{\circ}\text{C}$  pour préparer les 6 bactéries lors des diverses expérimentations ultérieures.

## **II.- COMPORTEMENT AUX BASSES TEMPÉRATURES DES BACTÉRIES SÉLECTIONNÉES**

Pour déterminer la durée de la phase de latence aux basses températures, ainsi que les autres caractéristiques de la croissance, on a effectué des cultures à 7°C, 5°C et jusqu'à 2°C, dans le milieu Fish. On a pu ainsi déterminer la durée permettant un développement à basse température. Le choix de la température de 2°C est fonction des normes de l'Arrêté de 1974 concernant les produits réfrigérés, qui doivent être conservés à des températures comprises entre 0°C et 3°C (Annexes II-III). Etant donné que la température de conservation de 0°C est rarement rencontrée dans les conservations, on a choisi 2°C comme basse température de référence pour ces essais et pour d'autres essais de conservation de filets de poisson effectués ultérieurement (cf chapitre 3).

On détaillera dans cette étude la croissance à 2°C et à 7°C: 2°C pour son intérêt dans la conservation des produits alimentaires, et 7°C comme température facilement atteinte si la chaîne du froid n'est pas respectée à un moment ou à un autre entre la production et la consommation du produit.

En l'absence d'un système de refroidissement dans le biophotomètre, on a utilisé une table d'agitation horizontale pour les températures inférieures à 30°C, et les cultures ont été faites dans des chambres tempérées réglées à la température souhaitée.

### **1.- *Enterococcus faecium*.**

#### **a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°C, 5°C et 7°C**

Dès la température de 2°C, on observe une croissance d'*Enterococcus faecium*. Pour toutes les températures étudiées, on note un important retard de croissance avec allongement de la durée des différentes phases de croissance par rapport aux conditions optimales à 37°C.

On obtient des concentrations bactériennes finales supérieures à 10<sup>8</sup> bactéries / ml (tableau III.13), mais avec des durées de phases différentes (Figure III.7). Aucune différence significative concernant la concentration bactérienne finale n'a été mise en évidence par rapport aux cultures effectuées dans des conditions optimales de croissance (37°C); mais aux basses températures, il faut plus de temps pour atteindre la même concentration (tableau III.13). Les températures basses agissent surtout sur les activités enzymatiques, qui se trouvent ainsi ralenties: il faut par conséquent plus de temps pour la croissance bactérienne, et particulièrement à 2°C (HUI, 1991).

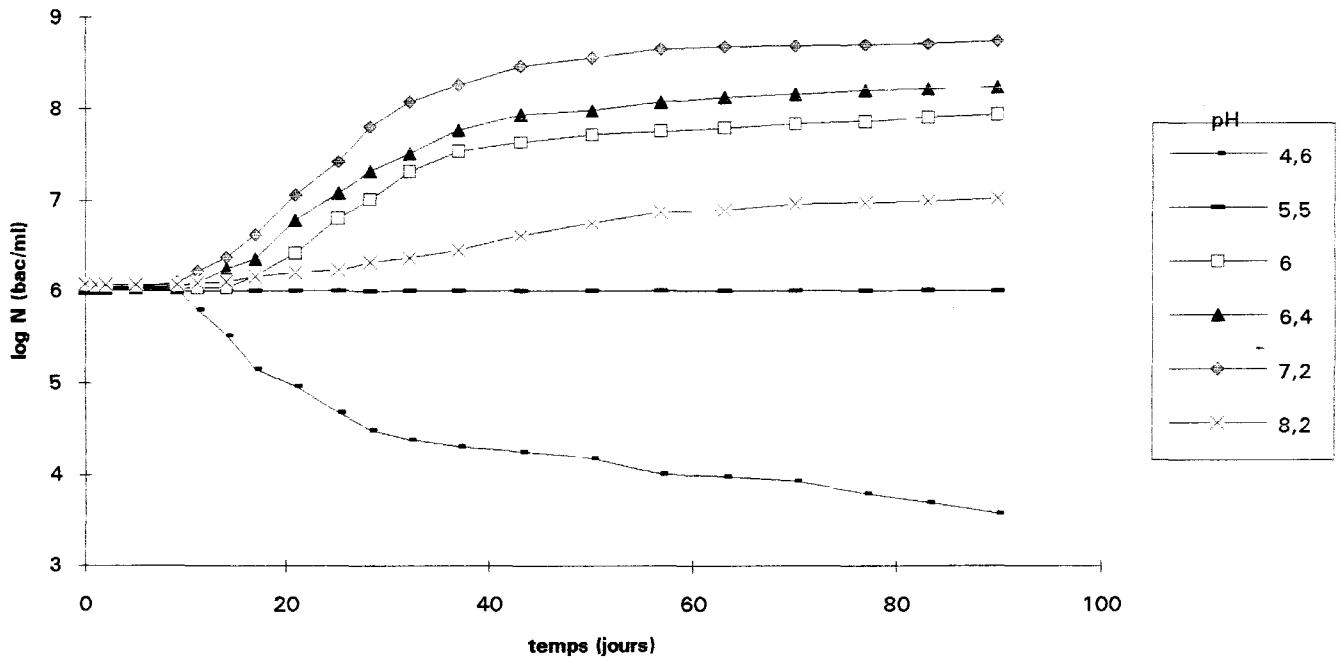


Figure n° III.7 : courbes de croissance d'*Enterococcus faecium* pour différents pH sous agitation à 2°C en milieu Fish.

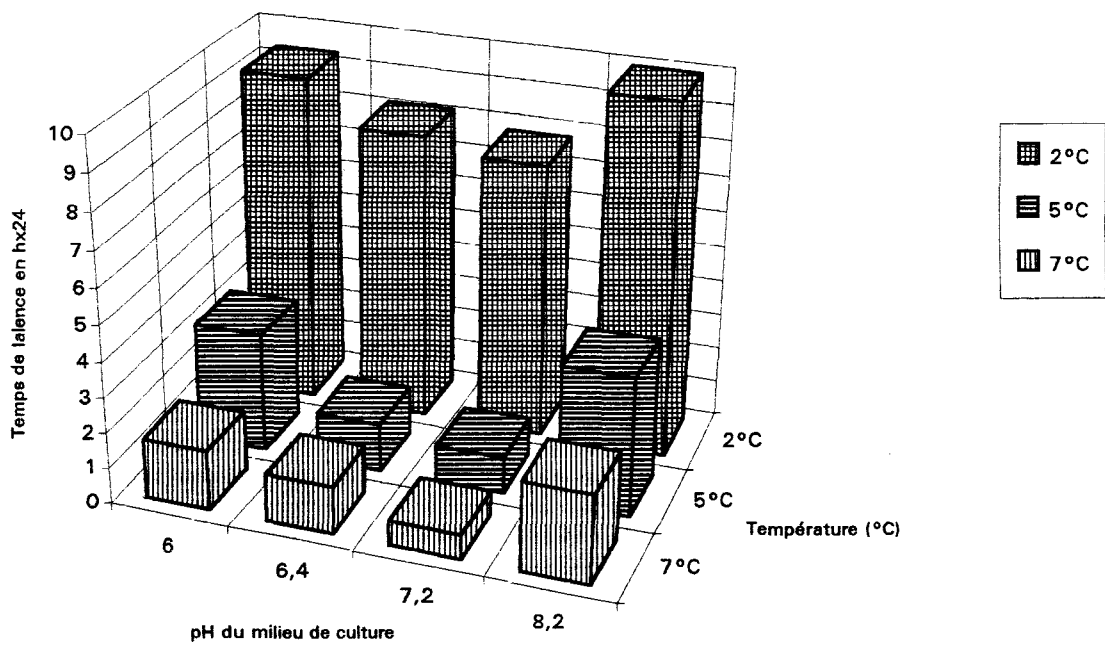


Figure n° III.8 : variation du temps de latence (LO) d'*Enterococcus faecium* pour différents pH et différentes températures de culture en milieu Fish. (Rotation du profil de 200°).

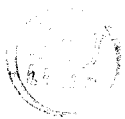


Tableau n° III.13 : Croissance d'*Enterococcus faecium* dans la zone de réfrigération à pH 7,2.

Température (°C)	2	5	7
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	0,017 ± 0,007	0,030 ± 0,005	0,041 ± 0,007
$\log N$ (bact. /ml)	8,74	8,65	8,36
temps en jours pour atteindre $N$	43	13	7

b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C

A cette température, aucune croissance significative n'a été détectée à des pH inférieurs à 5,5, mais la population bactérienne a été capable de survivre plus de 90 jours. Cependant, à pH 4,6, seule une faible partie de la population a résisté dans ces conditions extrêmes. A pH 8,2, le démarrage de la croissance est très difficile, avec une phase de latence de près de 10 jours, et une phase exponentielle de 20 jours; le taux de croissance est de  $(0,008 \pm 0,005) h^{-1}$  (figure III.7). A pH 7,2, on a eu la même concentration finale qu'à 37°C ( $5,5 \cdot 10^8$  bactéries /ml) mais avec des durées très différentes.

Tableau n° III.14 : Cinétique de croissance d'*Enterococcus faecium* en milieu Fish, à 2°C, pendant 90 jours, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,20	0,010 ± 0,005	0,976	9,31	7,94
6,4	6,55	0,012 ± 0,002	0,997	8,12	8,24
7,2	7,42	0,017 ± 0,007	0,957	7,76	8,74
8,2	8,23	0,008 ± 0,005	0,932	9,94	7,02

La croissance est très faible et à des pH inférieurs à 6, elle est quasiment absente en dessous de pH 5. A pH 4,6, la population bactérienne baisse considérablement, elle passe de  $10^6$  à  $1,3 \cdot 10^3$  (figure III.7).

Si le temps de latence est de quelques minutes à 37°C, il est ici de plusieurs jours (figure III.8) et il dépend du pH du milieu : entre pH 6 et pH 8,2, ce temps de latence est en effet d'environ 7 à 10 jours pour les cultures effectuées (Tableau III.14).



### c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C

A la température de 7°C, on n'a pas noté de croissance à des pH inférieurs à 5,5 pour une durée de 10 jours; par contre, entre pH 6 et 8,2, il y a une croissance bactérienne, mais elle est ralentie par rapport à celle obtenue dans des conditions optimales croissance à 37°C.

Tableau n° III.15 : Cinétique de croissance d'*Enterococcus faecium* en milieu Fish, à 7°C, pendant 10 jours, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,30	0,020 ± 0,001	0,952	1,68	8,20
6,4	6,49	0,027 ± 0,005	0,958	1,32	8,30
7,2	7,56	0,041 ± 0,007	0,951	0,68	8,36
8,2	8,23	0,024 ± 0,006	0,971	2,47	8,31

La croissance d'*Enterococcus faecium* est ralentie et les différentes phases de la croissance sont allongées. Entre pH 6 et 8,2, la concentration bactérienne finale est supérieure à 10<sup>8</sup> bactéries / ml., le temps de latence dépend du pH (il est de 16 heures à pH 7,2 et de deux jours et demi à pH 8,2). Le pH mesuré à la fin de l'expérimentation augmente.

## 2.- Staphylococcus aureus

### a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°C, 5°C et 7°C

*Staphylococcus aureus* se développe aux températures de réfrigération, mais la croissance bactérienne est lente avec des phases de croissance longues. A basse température, on obtient des concentrations bactériennes proches des concentrations finales obtenues pour les cultures effectuées dans des conditions optimales (37°C) (tableau III.16). Cependant, il a fallu beaucoup plus de temps à ces cultures pour atteindre ces concentrations (90 jours au lieu de 1 jour). Les températures de réfrigération retardent la croissance des micro-organismes, même chez les psychrotrophes, qui se développent lentement à basse température (HUI, 1991).

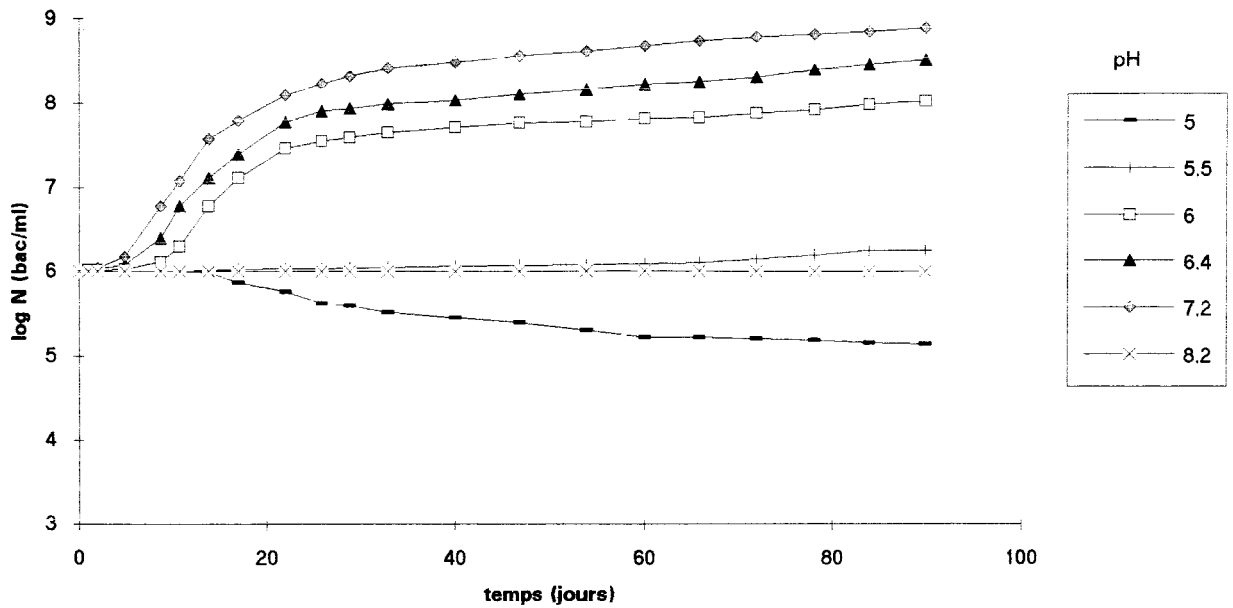


Figure n° III.9 : courbes de croissance de *Staphylococcus aureus* pour différents pH sous agitation à 2°C en milieu Fish.

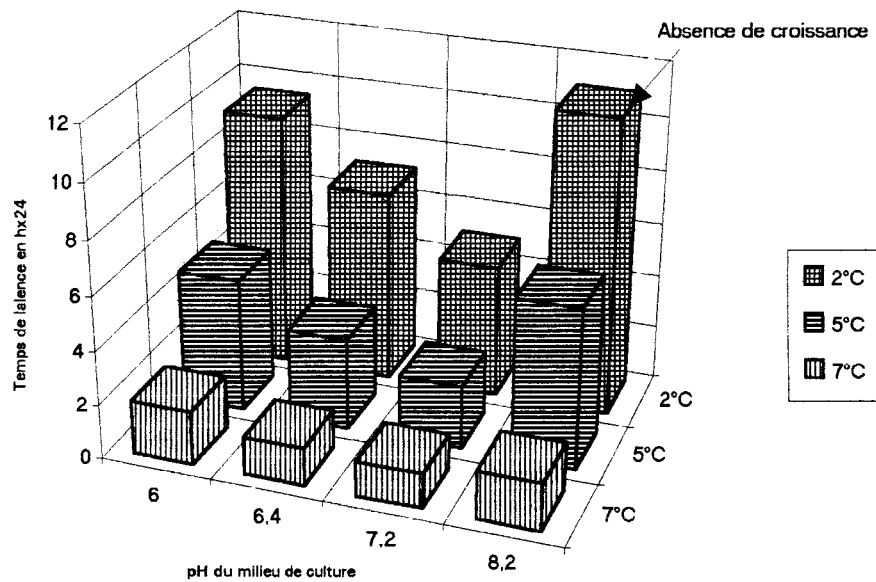


Figure n° III.10 : variation du temps de latence (LO) de *Staphylococcus aureus* pour différents pH et différentes températures de culture en milieu Fish. (Rotation du profil de 200°).



Tableau n° III.16 : Croissance de *Staphylococcus aureus* dans la zone de réfrigération à pH 7,2.

Température (°C)	2	5	7
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	0,017 ± 0,006	0,029 ± 0,003	0,060 ± 0,003
$\log N$ (bact. /ml)	8,55	8,56	8,50
temps en jours pour atteindre $N$	47	16	7

Aux températures de 5°C et 7°C, les concentrations finales les plus élevées ont été également trouvées à pH 7,2. Elles sont de  $3,2 \cdot 10^8$  bactéries / ml à 7°C en 10 jours et  $3,6 \cdot 10^8$  bactéries / ml à 5°C en 30 jours (tableau III.16).

b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C

Les durées des différentes phases de croissance sont très allongées. Le temps de latence dépend du pH de la culture (allant de 5 à 9 jours environ) (figures III.9 & III.10). *Staphylococcus aureus* ne se développe ni à pH 8,2, ni à des pH inférieurs à 6.

Tableau n° III.17 : Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en milieu Fish, à 2°C, pendant 90 jours, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,13	0,016 ± 0,009	0,983	9,40	7,18
6,4	6,58	0,019 ± 0,010	0,982	7,11	8,60
7,2	7,37	0,017 ± 0,009	0,973	4,95	8,75

En dessous de pH 6, le développement de *Staphylococcus aureus* est limité, et la population finale chute aux pH 4,6 et 5. A pH 4,6, il y a une baisse de  $10^6$  bactéries / ml jusqu'à  $3 \cdot 10^5$  bactéries / ml pour une durée de 90 jours. Le taux de croissance chute rapidement aux températures de réfrigération et la croissance est très faible.

### c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C

A cette température, la multiplication de *Staphylococcus aureus* est ralentie en comparaison avec les résultats à 37°C. A pH 7,2, le taux de croissance est faible ( $0,060 \pm 0,003$ ) h<sup>-1</sup>, la population finale est inférieure de 58 % au résultat le plus élevé obtenu à 37°C.

Tableau n° III.18 : Cinétique de croissance de *Staphylococcus aureus* en milieu Fish, à 7°C, pendant 10 jours, à différents pH.

pH initial	pH final	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (j)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. (h <sup>-1</sup> )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,35	$0,037 \pm 0,009$	0,980	1,98	7,34
6,4	6,52	$0,053 \pm 0,004$	0,959	1,40	8,47
7,2	7,42	$0,060 \pm 0,003$	0,963	1,29	8,50
8,2	8,29	$0,051 \pm 0,014$	0,973	1,76	7,72

A des pH inférieurs à 6, la croissance est très faible, et elle est quasiment nulle à pH 4,6. Le temps de latence est inférieur à 2 jours pour des cultures effectuées entre pH 6 et 8,2; si la croissance bactérienne est supérieure à 10<sup>8</sup> bactéries / ml entre pH 6,4 et pH 7,2, elle baisse sensiblement pour les autres pH étudiés (Tableau III.18).

### 3.- *Yersinia enterocolitica* 1

#### a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°C, 5°C et 7°C

*Yersinia enterocolitica* 1 se développe à des températures de réfrigération (2 à 7°C); pour ces zones de températures, il y a un retard de croissance et les bactéries se développent très lentement. On obtient des concentrations bactériennes finales proches des conditions optimales de croissance, mais avec des durées très différentes (1 jour à 37°C et plusieurs semaines à 2°C) (tableau III.19). Plusieurs travaux ont montré que *Yersinia enterocolitica* est capable de se développer à des températures basses; STANFIELD et al., 1985, ont obtenu un développement lent de *Yersinia enterocolitica* jusqu'à des températures proches de +1°C.

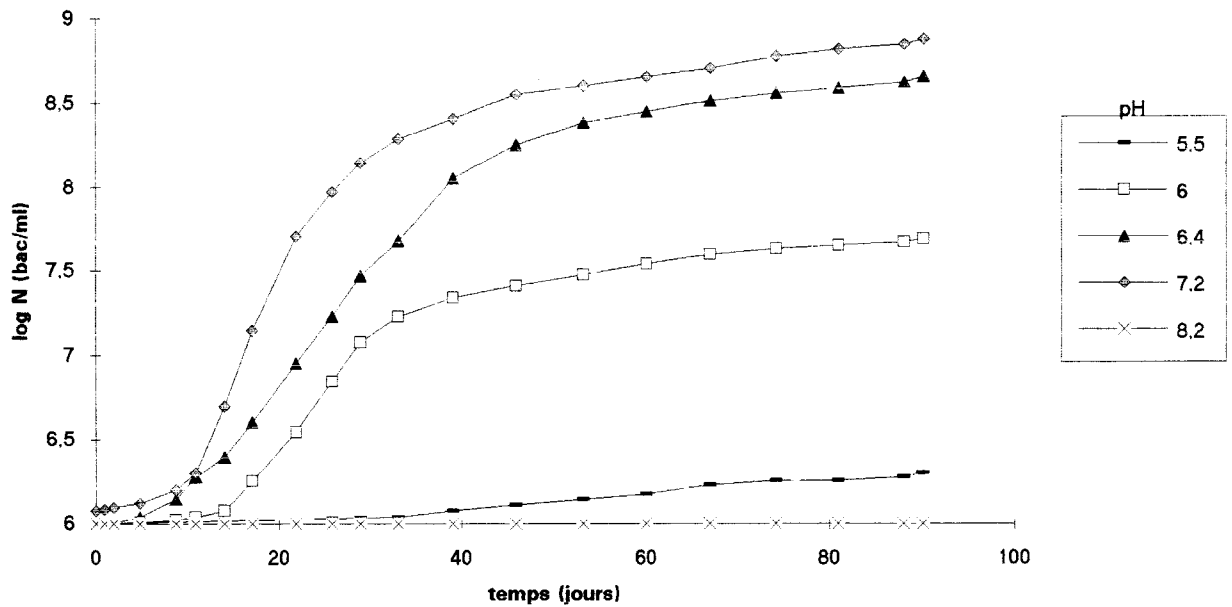


Figure n° III.11 : courbes de croissance de *Yersinia enterocolitica* 1 pour différents pH sous agitation à 2°C en milieu Fish.

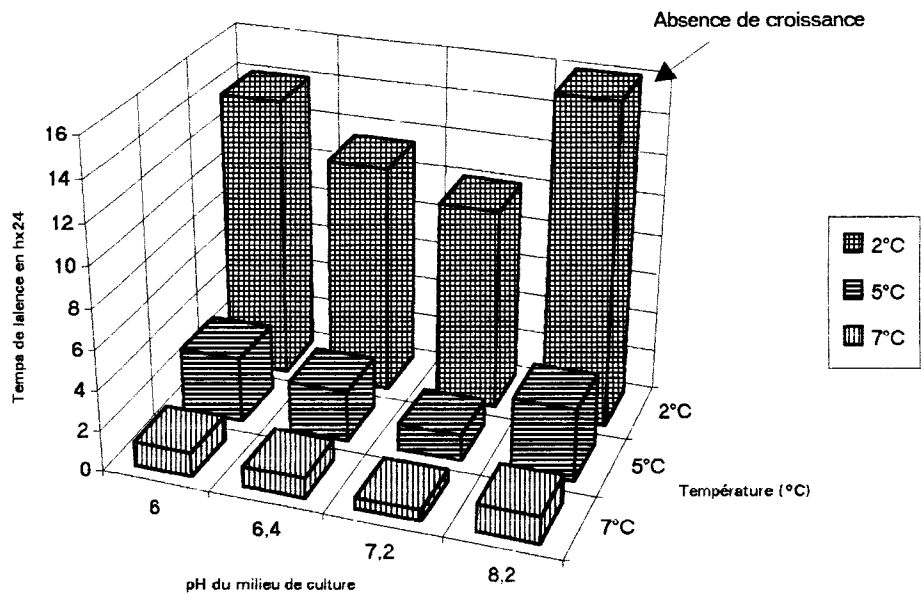


Figure n° III.12 : variation du temps de latence (LO) de *Yersinia enterocolitica* 1 pour différents pH et différentes températures de culture en milieu Fish. (Rotation du profil de 200°).

Tableau n° III.19 : Croissance de *Yersinia enterocolitica* 1 dans la zone de réfrigération à pH 7,2.

Température (°C)	2	5	7
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	$0,015 \pm 0,005$	$0,057 \pm 0,011$	$0,073 \pm 0,006$
$\log N$ (bact. /ml)	8,47	8,44	8,84
temps en jours pour atteindre $N$	46	8	6

b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C

A cette température, *Yersinia enterocolitica* 1 se développe très faiblement. Les différentes phases de croissance sont très allongées, leurs durées passent à plusieurs jours. A pH 8,2, on n'a pas observé de croissance significative (figure III.11).

Tableau n° III.20 : Cinétique de croissance de *Yersinia enterocolitica* 1 en milieu Fish, à 2°C, pendant 90 jours, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,22	$0,010 \pm 0,002$	0,989	14	7,69
6,4	6,71	$0,011 \pm 0,001$	0,998	11,4	8,71
7,2	7,53	$0,015 \pm 0,005$	0,996	10	8,81

A des pH inférieurs à 5, la croissance est quasiment absente. A pH 4,6, la concentration bactérienne initiale est passée de  $10^6$  bactéries / ml à  $10^3$  bactéries / ml pour une période de 90 jours. A pH 7,2, le taux de croissance chute considérablement entre 37°C et 2°C, il passe de  $(0,996 \pm 0,020) h^{-1}$  à  $(0,015 \pm 0,005) h^{-1}$ .

c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C

Pour tous les pH, les différentes phases de croissance sont allongées et les taux de croissance chutent, comparés à la croissance à 37°C. Le temps de latence est plus long et

dépend du pH de la culture (allant de 12 heures à 28 heures pour des pH entre 6 et 8,2) (Tableau III.21).

Tableau n° III.21 : Cinétique de croissance de *Yersinia enterocolitica* 1 en milieu Fish, à 7°C, pendant 10 jours, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,20	0,055 ± 0,020	0,991	1,18	8,51
6,4	6,55	0,077 ± 0,014	0,992	1,00	8,77
7,2	8,41	0,073 ± 0,006	0,999	0,54	8,84
8,2	8,27	0,076 ± 0,006	0,978	1,14	8,82

A cette température, il y a également augmentation du pH mesuré en fin de croissance. Aucune croissance n'a été détectée à des pH inférieurs à 5, et les temps de latence s'allongent avec la diminution du pH (figure III.12). A pH 6, en particulier, la population bactérienne totale est presque identique à celle obtenue à 37°C (environ  $2 \cdot 10^8$  bactéries / ml) mais il faut plusieurs jours pour atteindre cette concentration.

A toute les températures testées, la croissance optimale est obtenue pour le pH 7,2. Aux pH 6,4 et 7,2, on a noté que la baisse de biomasse finale entre les différentes températures n'est pas significative et il faut plusieurs dizaines de jours à 2°C pour atteindre la même concentration bactérienne qu'à 37°C.

#### **4.- Yersinia enterocolitica 2**

##### **a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°, 5° et 7°C**

Aux températures basses, la croissance bactérienne est ralentie, avec des phases de croissance allongées, mais les concentrations bactériennes finales sont équivalentes à celles obtenues dans les conditions optimales de croissance à 37°C (tableau III.22). Cependant, dans ces conditions défavorables, il a fallu plusieurs jours ou plusieurs semaines pour atteindre la même concentration. *Yersinia enterocolitica* est un psychrotrophe qui se développe aux températures de réfrigération (McMULLEN, 1989). Comme déjà mentionné, STANFIELD et al., 1985, ont obtenu un développement lent de *Yersinia enterocolitica* jusqu'à des températures proches de +1°C.

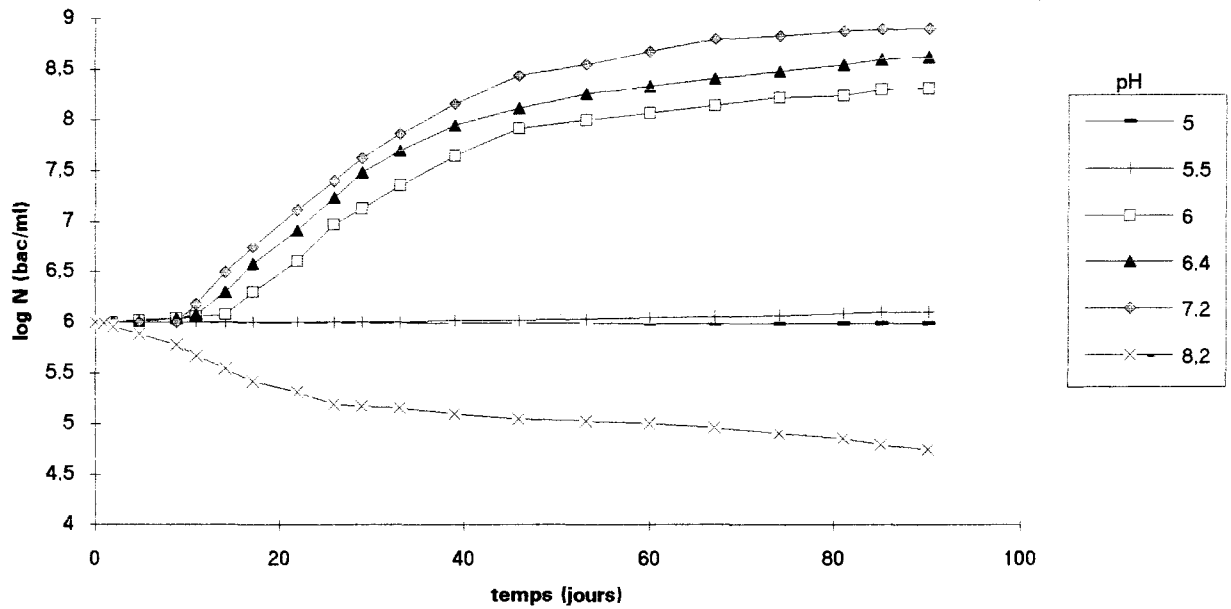


Figure n° III.13 : courbes de croissance de *Yersinia enterocolitica* 2 pour différents pH sous agitation à 2°C en milieu Fish.

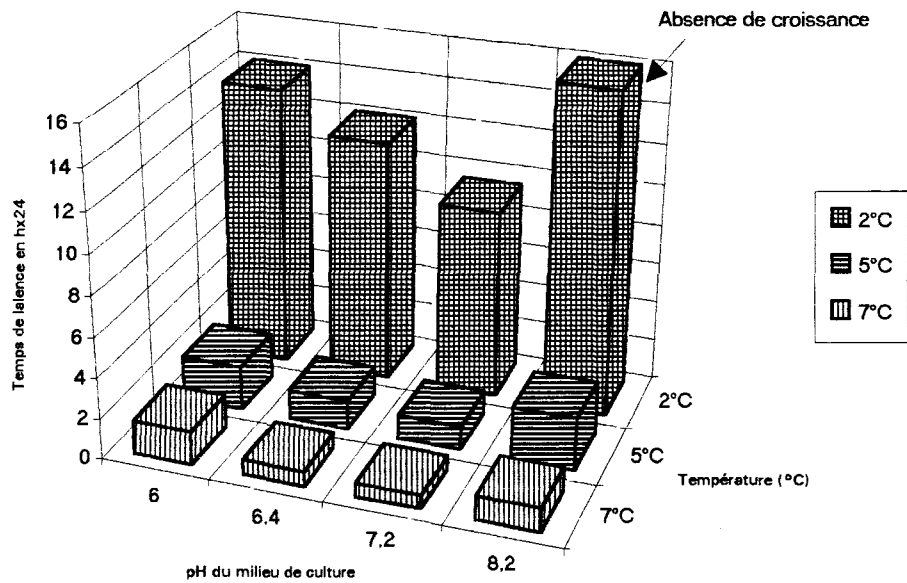


Figure n° III.14 : variation du temps de latence (LO) de *Yersinia enterocolitica* 2 pour différents pH et différentes températures de culture en milieu Fish. (Rotation du profil de 200°).





Tableau n° III.22 : Croissance de *Yersinia enterocolitica* 2 dans la zone de réfrigération à pH 7,2.

Température (°C)	2	5	7
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	0,063 ± 0,001	0,084 ± 0,009	0,096 ± 0,008
$\log N$ (bact. /ml)	8,90	8,89	8,93
temps en jours pour atteindre $N$	46	8	6

b. - Caractéristiques de la croissance à 2°C

Le développement est très faible à cette température, les phases de latence et les phases exponentielles sont très allongées et par conséquent les taux de croissance sont très faibles.

Tableau n° III.23 : Résultats de l'étude cinétique de *Yersinia enterocolitica* 2 en milieu Fish, à 2°C, pendant 90 jours, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (j)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,18	0,004 ± 0,004	0,956	14,00	8,34
6,4	6,51	0,006 ± 0,003	0,995	12,04	8,69
7,2	7,31	0,0063 ± 0,001	0,999	9,42	8,91

A pH 6, la concentration bactérienne finale est identique à celle obtenue à 37°C, mais la durée de la phase de latence passe de 2 heures 24 minutes à 37°C, à 2 semaines à 2°C (figure III. 14). A pH 6,4,, la concentration bactérienne finale diminue d'environ 12% par rapport à celle obtenue à pH 6,4 à 37°C. Si le temps de latence est nul à 37°C, il passe à 12 jours à 2°C. A pH 7,2, le temps de latence est égal à 9,42 jours mais la concentration bactérienne finale est diminuée seulement de 9 % par rapport au résultat obtenu à 37°C, avec toutefois des phases de croissance très allongées. A pH 8,2, il n'y a aucune croissance (Figure III. 13).

### c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C

A cette température, malgré une concentration bactérienne importante au bout d'une dizaine de jours, *Yersinia enterocolitica* 2 se développe lentement; la phase de latence est d'au moins une demi-journée (tableau III.24). La phase exponentielle est allongée, elle dure plusieurs jours.

Tableau n° III.24 : Cinétique de croissance de *Yersinia enterocolitica* 2 en milieu Fish, à 7°C, pendant 10 j, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,27	0,081 ± 0,007	0,980	1,66	8,84
6,4	6,58	0,087 ± 0,007	0,981	0,75	8,88
7,2	7,43	0,096 ± 0,007	0,977	0,66	8,93
8,2	8,21	0,080 ± 0,009	0,996	1,18	8,89

Pour la zone de pH 6-8,2, la concentration bactérienne est supérieure à  $10^8$  bactéries / ml. A pH 7,2, la population finale est inférieure de 5 % seulement au meilleur résultat obtenu à 37°C, mais pour une durée de plusieurs jours. La croissance bactérienne est très faible à des pH inférieurs à 6.

### 5.- *Micrococcus varians*

#### a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°, 5° et 7°C

Aux températures étudiées, malgré un retard de croissance des bactéries et des phases de croissance très allongées, on obtient des concentrations bactériennes supérieures à  $10^8$  bactéries / ml, du même ordre que les concentrations obtenues dans les conditions normales de développement à 37°C. Cependant, à 2°C, il a fallu plusieurs jours pour atteindre la même concentration (90 jours) (Figure III.15). Cet allongement de la durée des phases peut s'expliquer par le fait qu'à ces températures, le métabolisme bactérien est ralenti. *Micrococcus varians* est une bactérie mésophile capable de se développer à des températures basses (HUI, 1991).

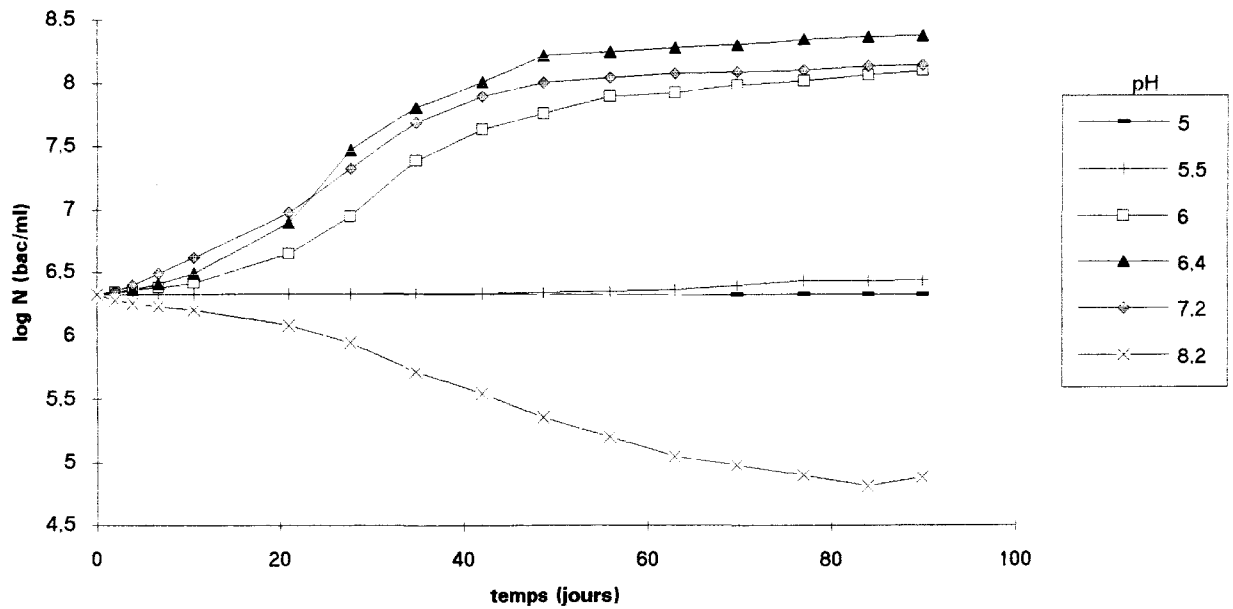


Figure n° III.15 : courbes de croissance de *Micrococcus varians* pour différents pH sous agitation à 2°C en milieu Fish.

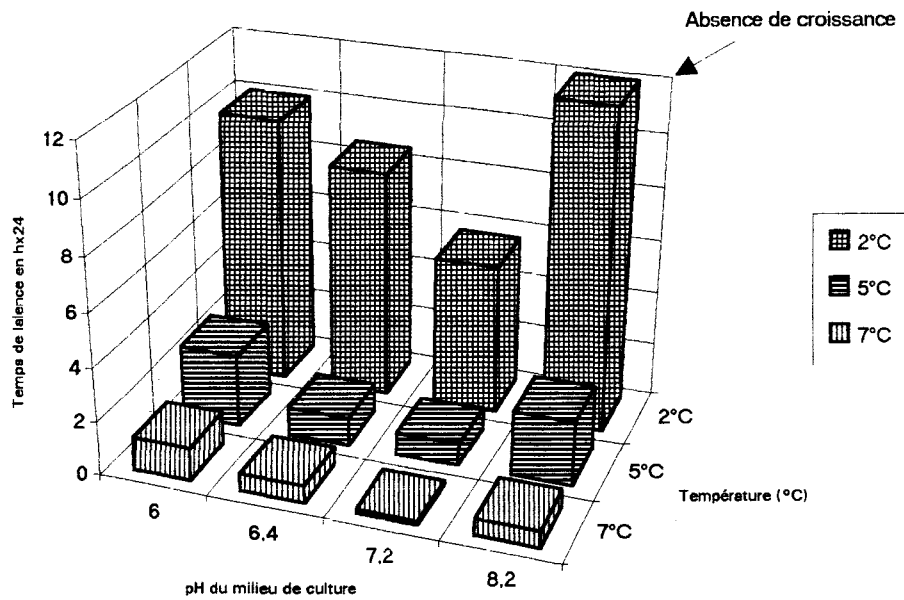


Figure n° III.16 : variation du temps de latence (LO) de *Micrococcus varians* pour différents pH et différentes températures de culture en milieu Fish. (Rotation du profil de 200°).



Tableau III.25 : Croissance de *Micrococcus varians* dans la zone de réfrigération à pH 7,2.

Température (°C)	2	5	7
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	$0,003 \pm 0,001$	$0,045 \pm 0,007$	$0,101 \pm 0,007$
$\log N$ (bact. /ml)	8,14	8,40	8,39
temps en jours pour atteindre $N$	49	10	6

A 2°C, la croissance est faible, le taux de croissance est seulement de  $(0,003 \pm 0,001)h^{-1}$ , alors qu'il est de  $(0,101 \pm 0,007) h^{-1}$  à 7°C (Tableau III.25). Les pH des cultures mesurés en fin d'expérimentation ont augmenté sensiblement, quel que soit le pH initial.

b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C

Aux températures de réfrigération, les temps de latence sont plus longs, de l'ordre de plusieurs jours à 2°C (figure III.16). La concentration bactérienne finale est légèrement inférieure au résultat optimal obtenu à 37°C. Il semble qu'à pH 6,4, on a l'optimum de croissance à cette température. A pH 8,2, absence de croissance bactérienne : la concentration bactérienne a baissé, elle passe de  $2.10^6$  bactéries / ml à  $7,6.10^4$  bactéries / ml en 90 jours (figure III.15).

Tableau n° III.26 : Cinétique de croissance de *Micrococcus varians* en milieu Fish, à 2°C, pendant 90 jours, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,26	$0,002 \pm 0,001$	0,992	9,96	8,10
6,4	6,55	$0,004 \pm 0,002$	0,995	8,52	8,38
7,2	7,46	$0,003 \pm 0,001$	0,999	5,61	8,14

Aux autres pH, les différentes phases de croissance sont plus longues que celles obtenues aux températures plus élevées. A pH 6, le démarrage de la croissance est très difficile, avec une phase de latence de 9,96 jours et une phase exponentielle de 35 jours (Figure III.15). A des pH inférieurs à 5,5, on constate au cours du temps une diminution de la concentration bactérienne de départ (Figure III.15).

### c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C

A cette température, *Micrococcus varians* se développe lentement, les différentes phases de croissance sont plus allongées que celles observées à 37°C. Entre pH 6 et 8,2, la concentration bactérienne finale reste importante par rapport aux cultures effectuées à 37°C. Aux pH 7,2 et 8,2, les concentrations finales ne diminuent que de 5 % ; à pH 6,4, la concentration bactérienne finale est inférieure de 11 % et à pH 6, la population finale diminue de 15 % (Tableau III.27).

Tableau III.27 : Cinétique de croissance de *Micrococcus varians* en milieu Fish, à 7°C, pendant 10 jours, à différents pH .

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,27	0,088 ± 0,002	0,971	1,23	8,43
6,4	6,51	0,089 ± 0,008	0,999	0,65	8,85
7,2	7,44	0,101 ± 0,007	0,983	0,15	8,88
8,2	8,29	0,107 ± 0,005	0,980	0,64	8,87

Le temps de latence dépend du pH de la culture, il passe de 3 heures et demie à pH 7,2 à 30 heures environ à pH 6. A des pH inférieurs à 6, la croissance bactérienne baisse et devient nulle à pH 4,6.

## 6.- *Pseudomonas paucimobilis*

### a.- Croissance à pH 7,2 aux températures de 2°, 5° et 7°C

A 7°C, dans ces conditions défavorables de croissance, la concentration bactérienne finale ne baisse pas beaucoup par rapport aux conditions optimales de croissance à 37°C (tableau III.28). La différence n'est donc pas significative, mais pour atteindre cette même concentration, il a fallu plusieurs jours à 7°C, et plusieurs semaines à 2°C (figure III.17). *Pseudomonas paucimobilis* est un psychrotrophe qui se développe à des températures de

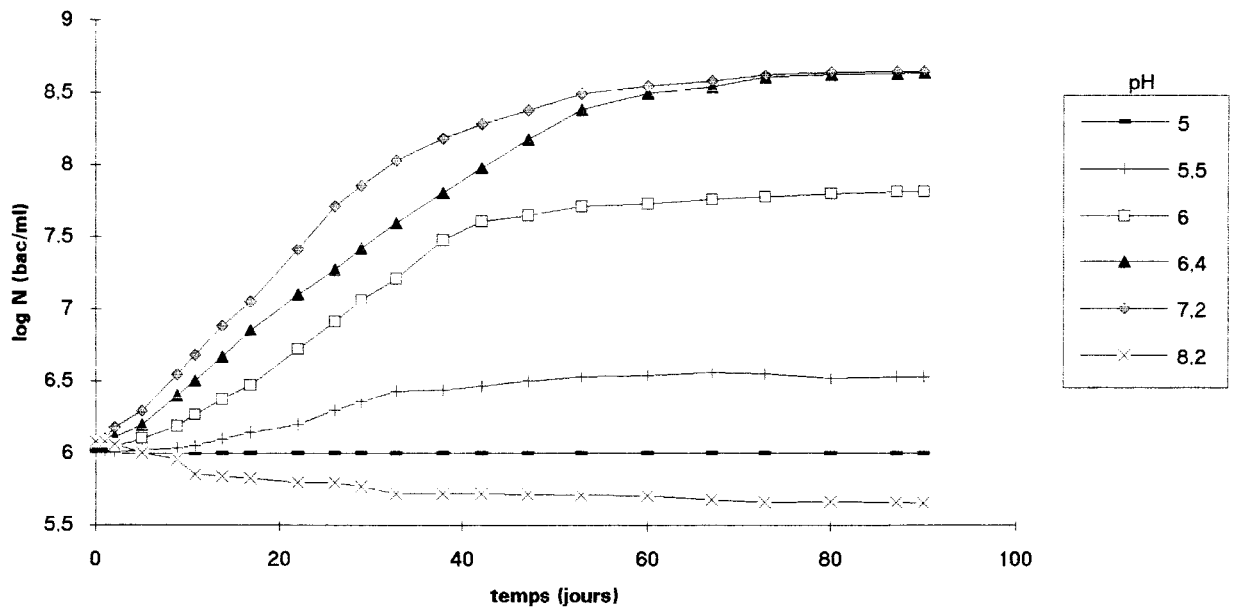


Figure n° III.17 : courbes de croissance de *Pseudomonas paucimobilis* pour différents pH sous agitation à 2°C en milieu Fish.

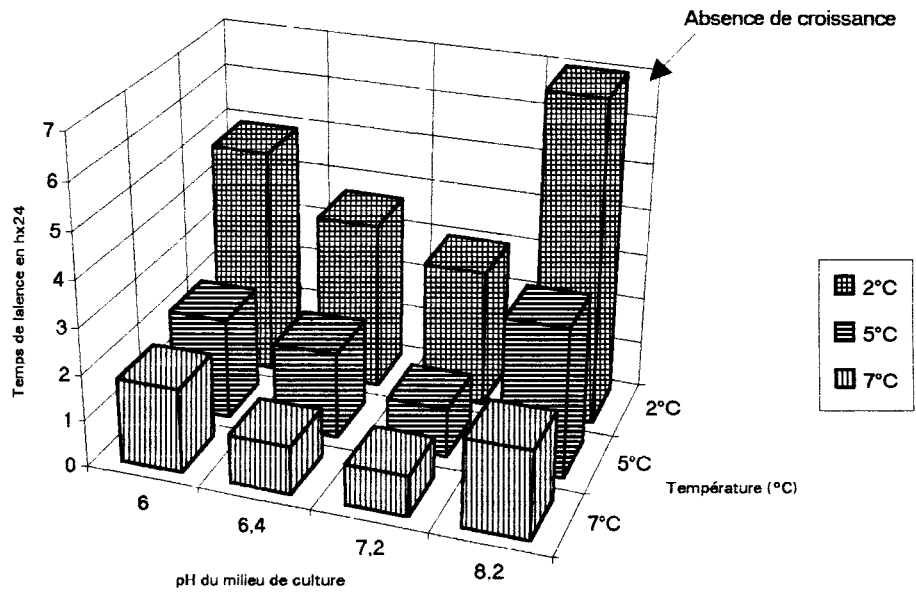


Figure n° III.18 : variation du temps de latence (LO) de *Pseudomonas paucimobilis* pour différents pH et différentes températures de culture en milieu Fish. (Rotation du profil de 200°).

réfrigération (HUI, 1991); à ces températures, il y a retard d'activité enzymatique et le développement est lent.

Tableau III.28 : Croissance de *Pseudomonas paucimobilis* dans la zone de réfrigération à pH 7,2.

Température (°C)	2	5	7
Taux de croissance ( $h^{-1}$ )	0,021 ± 0,006	0,044 ± 0,012	0,095 ± 0,012
$\log N$ (bact. /ml)	8,65	8,89	8,82
temps en jours pour atteindre $N$	50	9	4

Les travaux de ENFORS et al., 1979, montrent bien que les *Pseudomonas* sont capables de se développer jusqu'à 4°C. Les observations faites dans cette étude permettent de constater que *Pseudomonas paucimobilis* est capable de se multiplier à 2°C, mais il a été rapporté dans le BERGEY'S Manual que *Pseudomonas paucimobilis* ne peut pas être cultivé à 5°C.

#### b.- Caractéristiques de la croissance à 2°C

A cette température, la croissance est faible, elle est absente à des pH inférieurs à 5,5. Mais on note surtout ici la réduction de la phase de latence (maximum 4,91 jours) par rapport aux autres bactéries étudiées : en effet SUTHERLAND et al., 1975, rapportent dans leurs travaux que si les bactéries lactiques apparaissent d'abord, *Pseudomonas*, dans les produits conservés à 4°C, apparaît avant toute autre bactérie de contamination.

Tableau III.29 : Cinétique de croissance de *Pseudomonas paucimobilis* en milieu Fish, à 2°C, pendant 90 jours, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bactéries /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,31	0,012 ± 0,004	0,981	4,91	7,81
6,4	6,64	0,019 ± 0,002	0,972	3,65	8,64
7,2	7,53	0,021 ± 0,001	0,989	2,96	8,65

A pH 8,2, il n'y a pas eu de croissance et la population bactérienne a baissé à la fin de l'expérimentation (figure III.17). Le pH final des cultures, mesuré en fin d'expérimentation, augmente sensiblement.

### c.- Caractéristiques de la croissance à 7°C

La diminution de la concentration bactérienne finale dépend du pH, elle est de l'ordre de 35 à 40 % du meilleur résultat obtenu à 37°C; le temps de latence passe de quelques minutes à 37°C à une dizaine d'heures à la température de 7°C, les durées des phases de latence ainsi que les phases exponentielles sont allongées, et les pH mesurés en fin d'expérimentation ont augmenté (tableau III.30).

Tableau n° III.30 : Cinétique de croissance de *Pseudomonas paucimobilis* en milieu Fish, à 7°C, pendant 10 jours, à différents pH.

pH initial	pH en fin d'expérience	Taux de croissance		temps de latence ( $L_0$ ) (J)	$\log N$ (bact. /ml)
		max. ( $h^{-1}$ )	Coefficient de corrélation $r$		
6	6,29	0,093 ± 0,005	0,976	1,82	8,79
6,4	6,57	0,086 ± 0,008	0,983	1,04	8,80
7,2	7,50	0,095 ± 0,006	0,984	0,87	8,82
8,2	8,26	0,080 ± 0,008	0,989	1,90	8,80

## 7.- Commentaires et conclusion

L'estimation des taux de croissance exponentielle est tout à fait acceptable puisque les valeurs moyennes des coefficients de corrélation étaient de  $0,980 \pm 0,023$  pour les cultures incubées à des températures comprises entre 2°C et 7°C. La validité de ces coefficients est toujours estimée supérieure ou égale à 0,95 %.

Toutes les bactéries étudiées sont capables de se développer jusqu'à des températures de + 2°C et présentent des comportements voisins aux basses températures. On a noté qu'à 2°C, les souches se développent lentement, et qu'il faut plusieurs jours pour démarrer la phase exponentielle de la croissance; ce retard est aussi fonction du pH du milieu. La comparaison de l'évolution de la croissance en fonction des différents pH de culture montre que l'augmentation de la phase de latence est beaucoup plus importante pour les pH inférieurs à 6 ou voisins de 8,2.

Pour *Enterococcus faecium*, on note à 2°C un important retard de croissance avec notamment un allongement de la phase de latence (plus d'une semaine en moyenne, tous pH



confondus). Pour *Staphylococcus aureus*, à 2°C, on note surtout l'absence de croissance à pH 8,2 et aux pH inférieurs à 6, avec pour les autres pH un retard sensible de la croissance et un allongement de la phase de latence. Aux basses températures, les 2 souches de *Yersinia enterocolitica* se développent très lentement, avec une période de latence d'au moins 10 jours; aucune croissance n'a été détectée à des pH inférieurs à 6. *Micrococcus varians* se développe lentement à 2°C: avec la baisse de la température, on note un important retard de croissance, qui s'accompagne d'un allongement de la phase de latence dû à la baisse de la température, et d'une absence de croissance à des pH inférieurs à 5,5. A ces basses températures, parmi les 6 bactéries testées à 2°C, *Pseudomonas paucimobilis* se développe relativement plus vite, avec une phase de latence plus courte par rapport aux autres bactéries. C'est cette bactérie qui se multiplie en premier aux températures de réfrigération.

Les contrôles de qualité des plats cuisinés concernent essentiellement la flore contaminante, qui est mésophile. Dans des conditions identiques de température et de pH, les bactéries sélectionnées se comportent de la même façon. En pratique, l'application de ces résultats dans l'industrie permettra d'augmenter la durée de conservation des produits de plusieurs jours, si les recettes des plats cuisinés sont préparées à des pH situés aux pH limites (inférieurs à 5,5 ou voisins de 8,2). Ces zones de pH permettent de freiner le développement des micro-organismes qui pourraient survivre dans les aliments après traitement thermique, et qui pourraient se développer si le froid n'était pas immédiatement appliqué après cuisson, ou encore si la chaîne du froid, de ce moment jusqu'à l'utilisation, était rompue au cours du stockage, du transport ou de la commercialisation.

En pratique, le pH moyen des plats cuisinés est voisin de 6,2, on rencontre rarement des plats à pH basique. Cependant, le degré de contamination semble varier avec la nature des ingrédients ajoutés et du pH final du plat: c'est ainsi qu'une sauce à la tomate (donc à pH acide) présente un risque moindre par rapport à une sauce crème (LEGRAND et al., 1978). Il n'est pas surprenant qu'une grande partie des plats cuisinés à sauce (les 2/3) soient des plats à sauce tomate. Ceci amène à penser qu'il faut encourager davantage la préparation, soit de plats sans sauce (car les contrôles d'hygiène montrent qu'ils sont moins souvent contaminés), soit de plats à base de sauce tomate.

*Chapitre 2*

**ÉTUDE DE LA THERMORÉSISTANCE**

## Chapitre 2

### ÉTUDE EXPERIMENTALE DE LA THERMORÉSISTANCE

---

On a utilisé pour cette étude les mêmes bactéries isolées des produits de la mer.

Etant donné le pH du poisson (6,1 à 6,9) et les pH retenus lors de la croissance bactérienne, on a choisi le pH 6,4 pour la suite des expériences de choc thermique.

Le suivi de l'évolution du paramètre de résistance à la chaleur pour chaque bactérie est effectué au moyen de tubes TDT différents de par la nature du milieu de suspension : les uns contiennent des bactéries dans du tampon phosphate, les autres contiennent des suspensions bactériennes dans du milieu Fish. C'est ce même milieu Fish, mais gélifié, qui a été utilisé après les chocs thermiques pour le dénombrement des bactéries.

Le dispositif utilisé pour ces expériences a été décrit par CHEFTEL, 1963, et utilisé par MULAK, 1990. Il consiste à immerger les tubes TDT contenant les bactéries dans un bain d'eau thermostaté à  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$  pendant des temps variables, dans la gamme des températures comprises entre  $52^{\circ}\text{C}$  et  $68^{\circ}\text{C}$ . Le chauffage des bactéries est arrêté en plongeant brutalement les tubes TDT dans un bain d'eau froide ( $4^{\circ}\text{C}$  max.).

L'exploitation de l'étude de la thermorésistance est effectuée sous forme de courbes et tableaux :

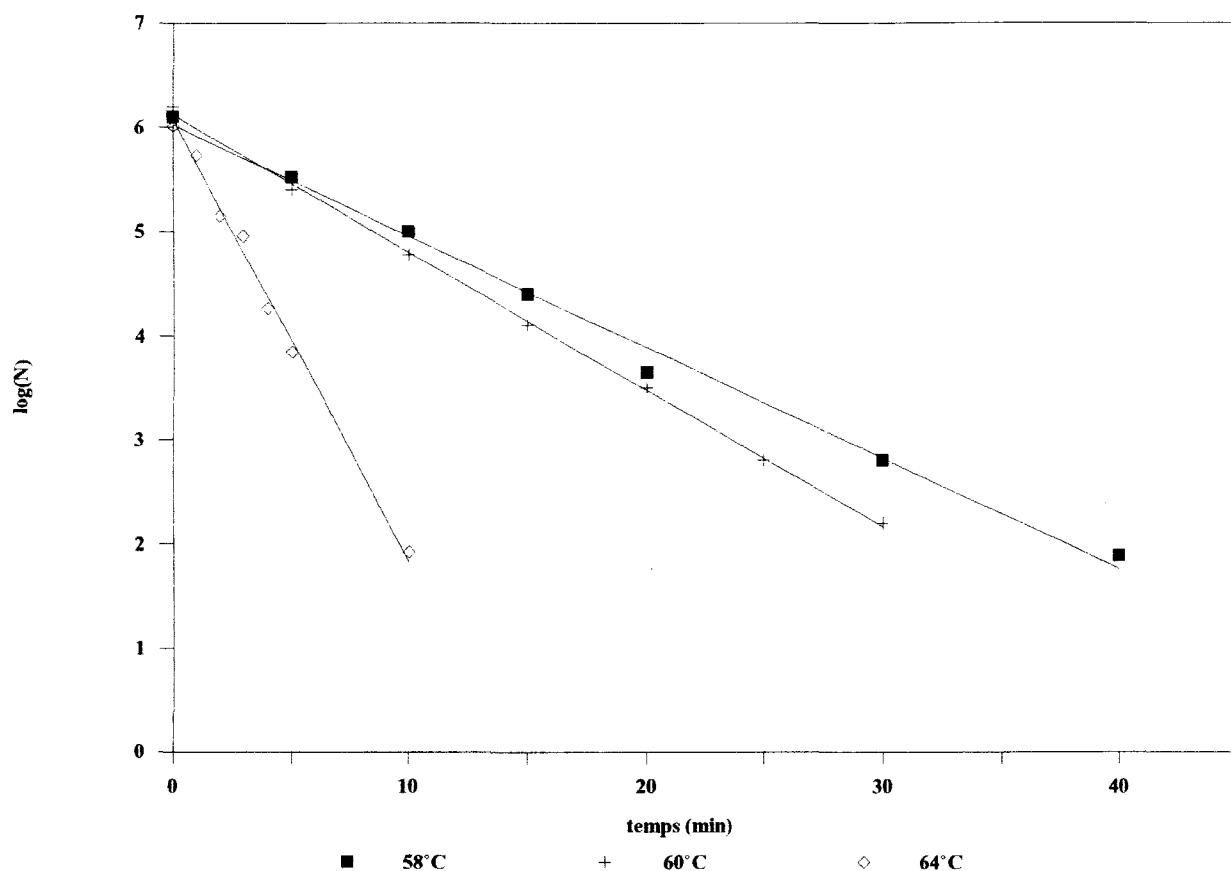
- chaque courbe de survie est accompagnée d'un tableau résumé où l'on a noté les caractéristiques des droites de régression : **a** représente la pente de la droite et **b** l'ordonnée à l'origine. On a également noté le nombre d'observations **m**, les coefficients de corrélation **r**, et les temps de réduction décimale ***D<sub>T</sub>***;

Chaque courbe de destruction thermique (courbes de TDT) est accompagnée d'un tableau où l'on a noté les caractéristiques des droites des régression, les données statistiques et les valeurs de **z** obtenues dans les différents milieux.

Afin de déterminer si les valeurs de  $z$  différaient significativement ou pas selon les milieux, on a fait une analyse statistique (test de comparaison de pente). Les résultats sont présentés en annexe V.

Les micro-organismes survivants ont été dénombrés sur milieu Fish et l'incubation a été réalisée à 37°C pendant 72 heures.

**Figure III.19 : *Enterococcus faecium***  
**Courbes de survie dans le milieu Fish.**



température (°C)	m	r	a	b	$D_T$ (min)
58	14	0,994	-0,107	6,023	9,4
60	14	0,998	-0,132	6,120	7,6
64	10	0,972	-0,425	6,074	2,4

**Tableau III.31 : Données statistiques des courbes de survie  
d'*Enterococcus faecium* dans le milieu Fish.**



## 1.- *Enterococcus faecium*

Les résultats de l'étude du traitement thermique d'*Enterococcus faecium* sont donnés figures III.19 à 21 et tableaux III.31 à 33.

Les valeurs de  $z$  d'*Enterococcus faecium* ne diffèrent pas significativement, pour le risque 5%, dans les deux milieux. Les valeurs de  $z$  d'*Enterococcus faecium* sont de 9,6°C, aussi bien en milieu Fish que dans le tampon phosphate.

Les courbes de TDT obtenues dans le milieu Fish sont au-dessus de celles obtenues dans le tampon phosphate. *Enterococcus faecium* est donc plus thermorésistant dans le milieu Fish.

Par ailleurs, à 64°C, il faut 2,5 minutes pour réduire de 90% la population d'*Enterococcus faecium* dans le milieu Fish et environ 1,8 minute dans le tampon phosphate.

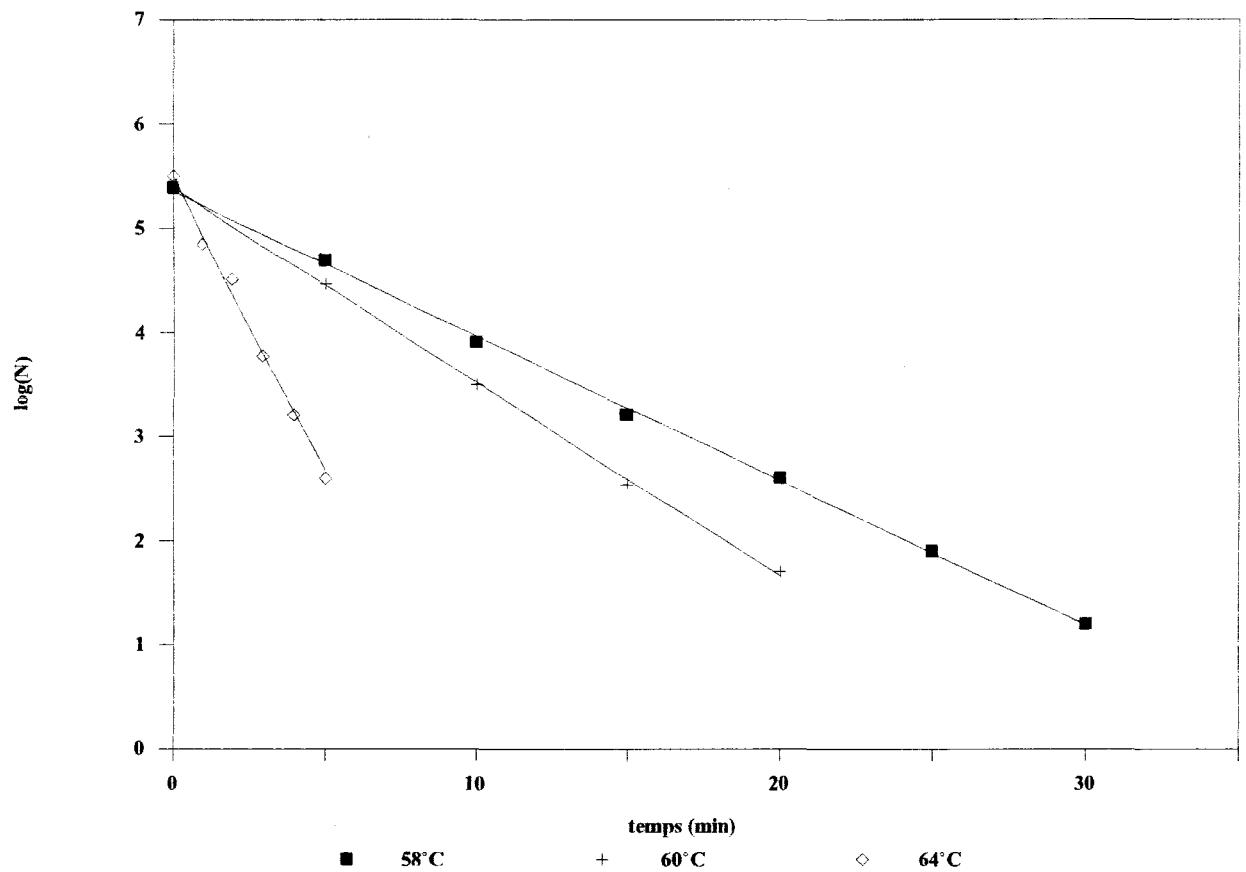
MULAK, 1990, a étudié la thermorésistance d'*Enterococcus faecium* dans du tampon phosphate, dans des filets de lieu noir et dans une terrine de poisson. A 64°C, elle a obtenu les valeurs suivantes : 3,2 minutes pour réduire de 90 % la population dans le tampon phosphate, 2 minutes dans du lieu noir et 7,9 minutes dans la terrine. En comparant ces résultats à ceux la présente étude, on constate qu'il faut à peu près le même temps pour réduire la population dans le lieu noir et dans le milieu Fish. Par contre, la valeur trouvée dans le tampon phosphate est nettement supérieure à celle trouvée ici.

En ce qui concerne les valeurs de  $z$ , on a trouvé la même valeur dans les deux milieux ( $z = 9,6^\circ\text{C}$ ). Cette valeur est supérieure à celle obtenue dans les travaux de MULAK, où  $z = 5,7^\circ\text{C}$  dans le tampon phosphate,  $4^\circ\text{C}$  dans le lieu Noir et  $5^\circ\text{C}$  dans la terrine. Par contre, les valeurs obtenues sont proche de celles de MAGNUS et al. (1986) : elles sont comprises entre  $7^\circ\text{C}$  et  $9,3^\circ\text{C}$  dans le tampon phosphate et entre  $9,6^\circ\text{C}$  et  $12,8^\circ\text{C}$  dans le bouillon de jambon.

OTT et al. (1960) ont étudié la thermorésistance d'*Enterococcus faecium* dans les pâtés de thon, de homard et de poisson blanc, ils ont trouvé des valeurs de  $D_T$  comprises entre 10,5 et 11,5 minutes, supérieures à celles obtenues ici (6,46 minutes en milieu Fish et 4,8 minutes en tampon phosphate). Ils ont trouvé des valeurs de  $z$  voisines de  $7^\circ\text{C}$ .

D'après l'ensemble de ces résultats, la thermorésistance d'une même bactérie peut varier d'un milieu à l'autre.

**Figure III.20 : *Enterococcus faecium***  
**Courbes de survie dans le tampon phosphate.**

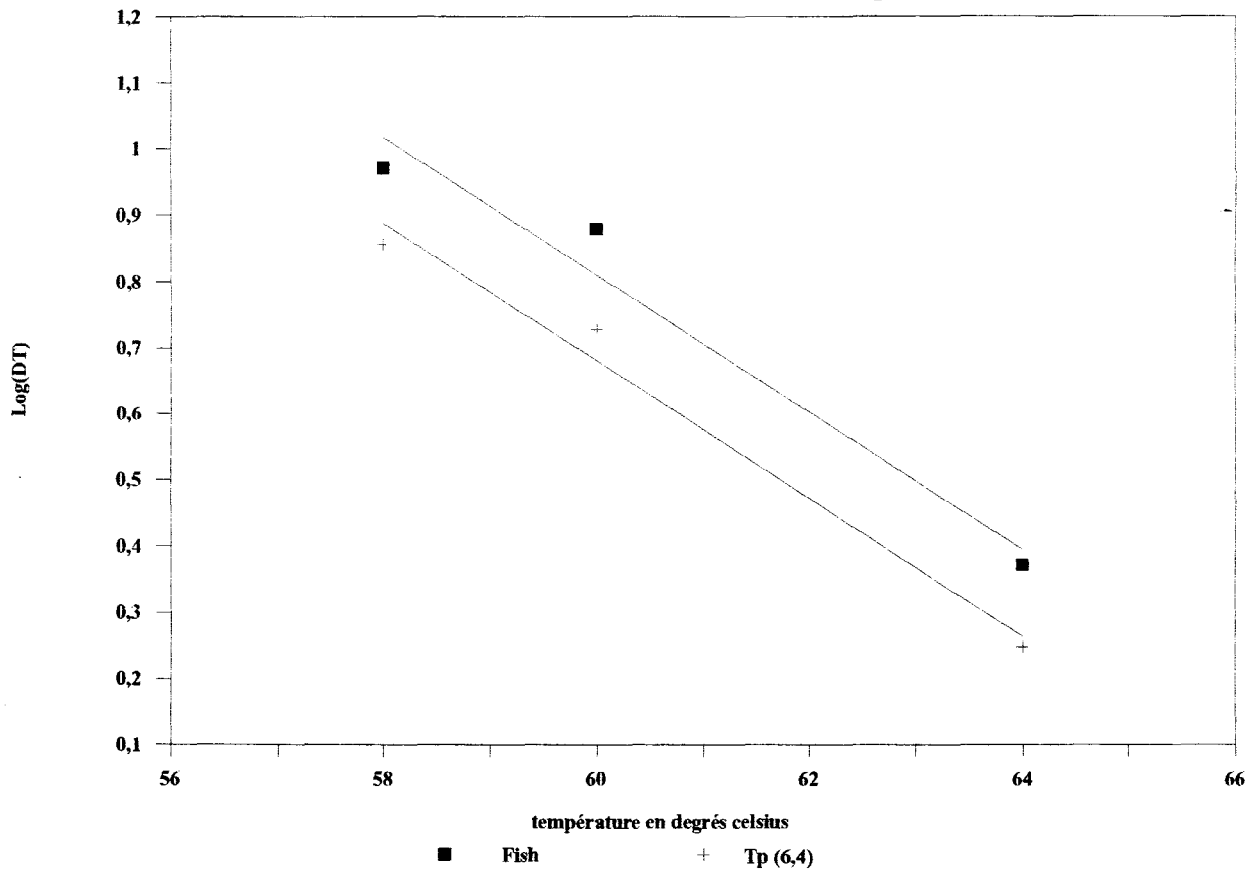


température (°C)	m	r	a	b	$D_T$ (min)
58	14	0,999	-0,139	5,360	7,2
60	10	0,999	-0,187	5,394	5,3
64	10	0,990	-0,567	5,502	1,8

**Tableau III.32 : Données statistiques des courbes de survie  
d'*Enterococcus faecium* dans le tampon phosphate.**



Figure III.21 : *Enterococcus faecium*  
 Courbes de destruction thermique.

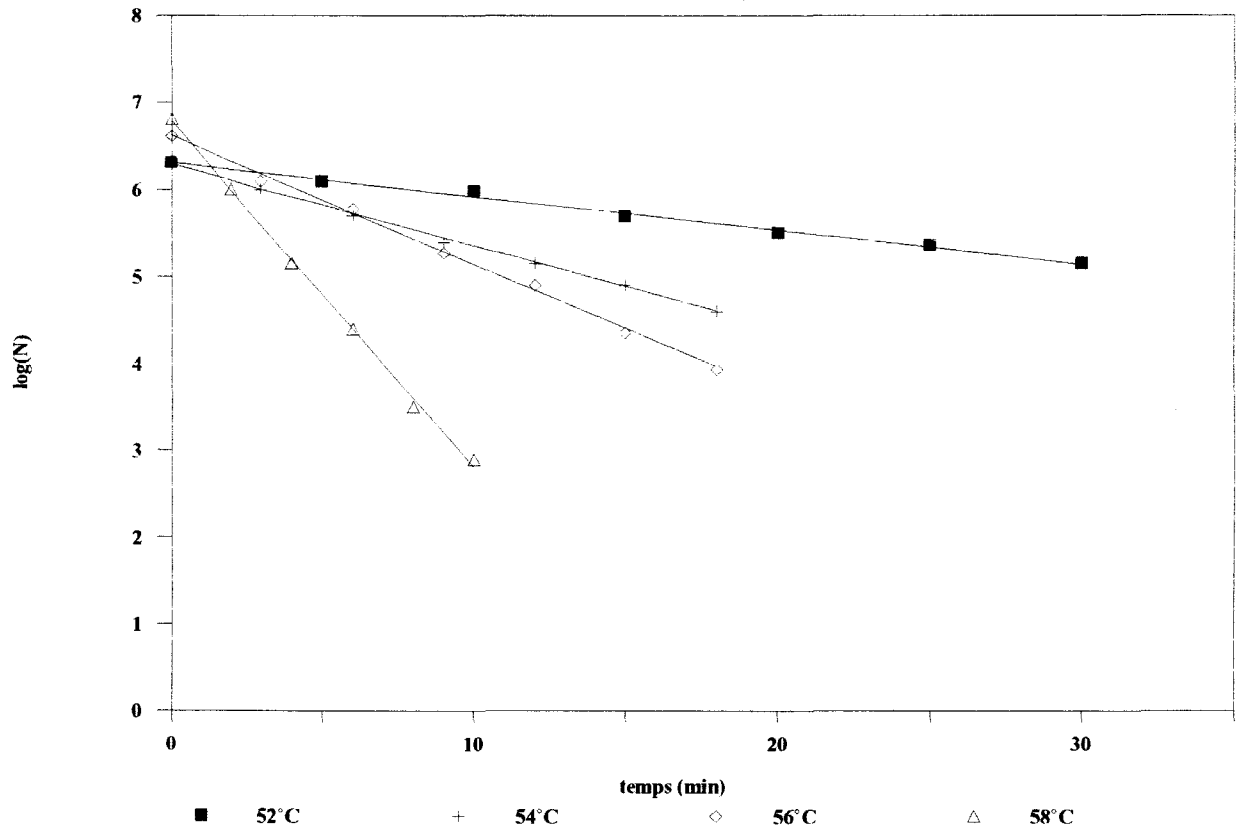


milieu	m	r	a	b	z (°C)
<b>Fish</b>	3	0,964	-0,10383	7,040	9,6
<b>Tampon phosphate</b>	3	0,986	-0,10408	6,925	9,6

Tableau III.33 : Données statistiques de destruction thermique d'*Enterococcus faecium* dans les différents milieux.



Figure III.22 : *Staphylococcus aureus*  
Courbes de survie dans le milieu Fish.



température (°C)	m	r	a	b	$D_T$ (min)
52	14	0,994	-0,0385	6,30214	25,9
54	14	0,999	-0,09345	6,276785	10,7
56	14	0,998	-0,14706	6,6007	6,8
58	12	0,998	-0,39718	6,7798	2,5

Tableau III.34 : Données statistiques des courbes de survie de *Staphylococcus aureus* dans le milieu Fish.

## 2.- Staphylococcus aureus

Les résultats de l'étude du traitement thermique de *Staphylococcus aureus* sont notés figures III 22 à 24 et tableaux III.34 à 36.

Les valeurs de  $z$  de *Staphylococcus aureus* sont significativement différentes pour le risque 5% dans les deux milieux (annexe V);  $z$  est plus élevé dans le tampon phosphate ( $z=10,3^{\circ}\text{C}$ ) que dans le milieu Fish ( $z = 6,2^{\circ}\text{C}$ ).

Les courbes de TDT obtenues dans les deux milieux se croisent à la température de  $59^{\circ}\text{C}$ . *Staphylococcus aureus* est donc plus thermorésistant dans le milieu Fish que dans le tampon phosphate aux températures strictement supérieures à  $59^{\circ}\text{C}$ .

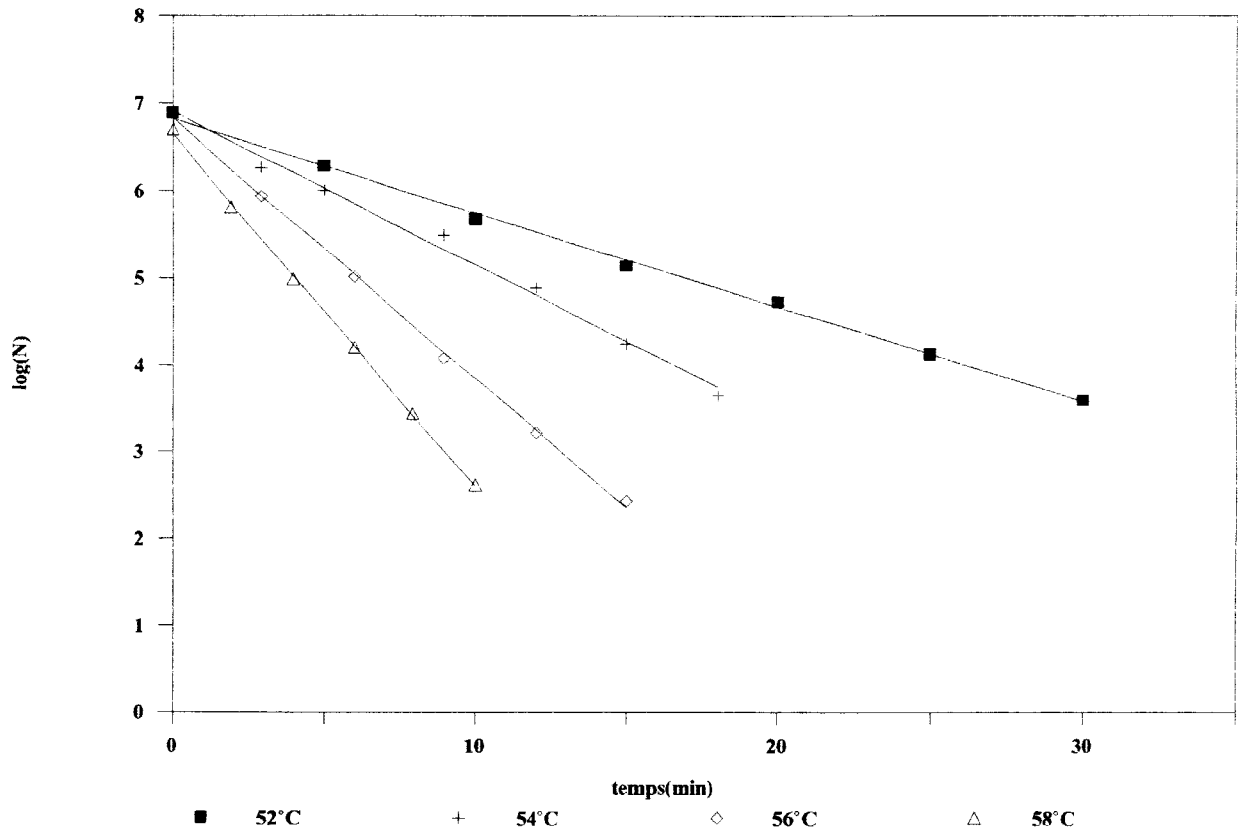
Les temps de réduction décimale à  $60^{\circ}\text{C}$ , déterminés à partir des courbes de TDT, sont de 1,5 minute dans le tampon phosphate et de 1,3 minute dans le milieu Fish. Ces valeurs sont inférieures à celles déterminées par SPENCER (1967) dans diverses volailles. Celui-ci a en effet obtenu des temps de réduction décimale à  $60^{\circ}\text{C}$  compris entre 2,2 et 5,45 minutes.

Les valeurs de  $z$  sont plus ou moins différentes puisque l'on a obtenu des valeurs variant de  $6,2$  à  $10,3^{\circ}\text{C}$  et SPENCER, des valeurs comprises entre 5 et  $6,83^{\circ}\text{C}$ .

Les valeurs de  $D_{60}$  obtenues dans du tampon phosphate et dans de l'eau sont sensiblement voisines de celles obtenues par HURST et HUGHES (1983) et GAZE (1985) : elles sont comprises entre 2,1 et 2,2 minutes.

MULAK, 1990, a également obtenu des valeurs de  $D_{60}$  voisines: 1,2 minute dans le tampon phosphate et 1,4 minute dans du lieu noir. Elle a obtenu des valeurs de  $z$  voisines de celles obtenues ici :  $8,7^{\circ}\text{C}$  dans le tampon phosphate,  $5,2^{\circ}\text{C}$  dans du lieu noir et  $6,2^{\circ}\text{C}$  dans la terrine.

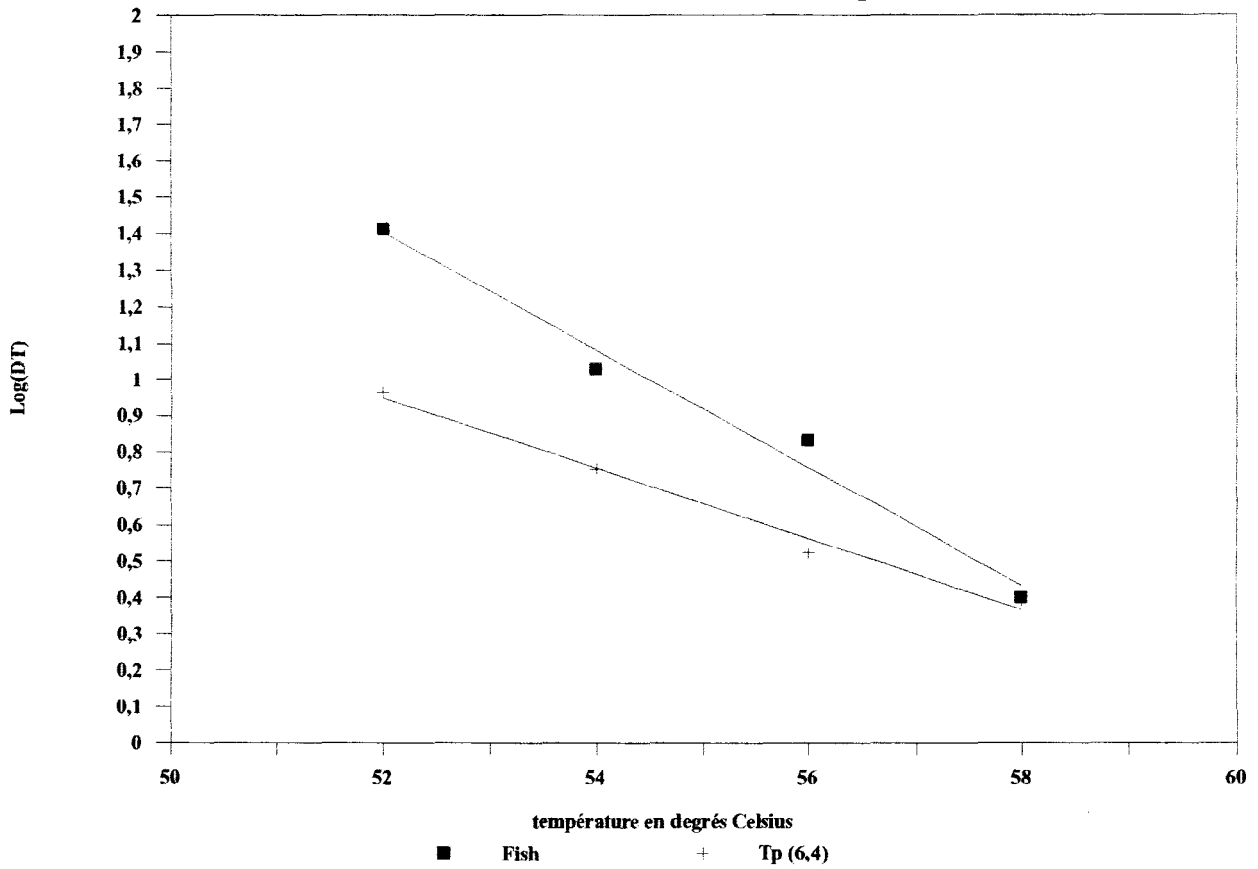
**Figure III.23 : *Staphylococcus aureus*  
Courbes de survie dans le tampon phosphate.**



température (°C)	n	r	a	b	$D_T$ (min)
52	14	0,997973	-0,10834	6,824	9,2
54	14	0,992355	-0,17646	6,912	5,7
56	12	0,998976	-0,29852	6,647	3,3
58	12	0,999413	-0,40466	6,023	2,5

**Tableau III.35 : Données statistiques des courbes de survie de  
*Staphylococcus aureus* dans le tampon phosphate.**

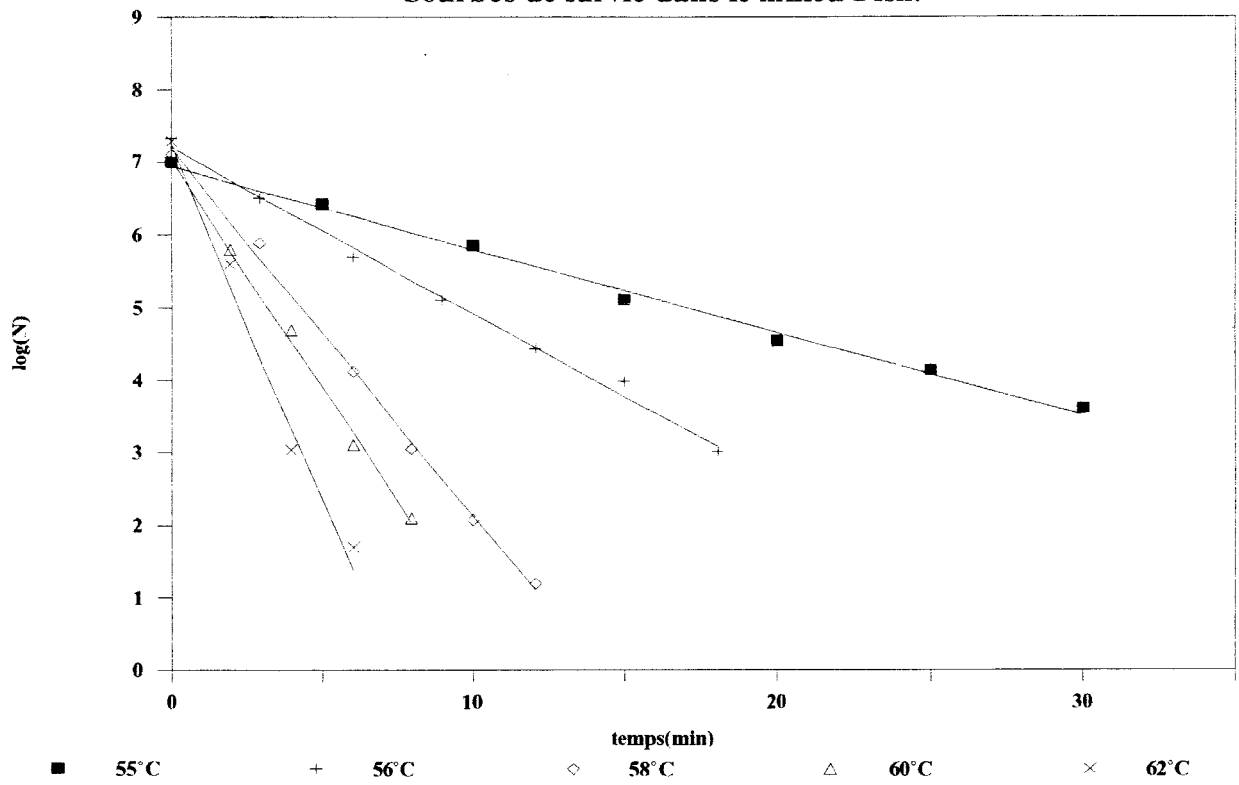
**Figure III.24 : *Staphylococcus aureus*  
Courbes de destruction thermique.**



milieu	m	r	a	b	z (°C)
<b>Fish</b>	4	0,982	-0,16177	9,817	6,2
<b>Tampon phosphate</b>	4	0,988	-0,09721	6,006	10,3

**Tableau III.36 : Données statistiques de destruction thermique  
de *Staphylococcus aureus* dans les différents milieux.**

**Figure III.25 : *Yersinia enterocolitica* 1  
Courbes de survie dans le milieu Fish.**



température (°C)	m	r	a	b	D <sub>T</sub> (min)
55	14	0,995	-0,114	6,949	8,7
56	14	0,994	-0,229	7,210	4,4
58	12	0,997	-0,506	7,197	2,0
60	8	0,996	-0,625	7,040	1,6
62	8	0,993	-0,979	7,252	1,0

**Tableau III.37 : Données statistiques des courbes de survie de *Yersinia enterocolitica* 1 dans le milieu Fish.**



### 3.- *Yersinia enterocolitica*

#### 3.a.- *Yersinia enterocolitica* 1

Les résultats de l'étude du traitement thermique de *Yersinia enterocolitica* 1 sont donnés figures III.25 à 27 et tableaux III.37 à 39.

Les valeurs de z de *Yersinia enterocolitica* 1 sont significativement différentes pour le risque 5% dans les deux milieux (annexe V). z est plus élevé dans le tampon phosphate (11,6°C) que dans le milieu Fish (8°C). *Yersinia enterocolitica* 1 est plus thermorésistante dans le milieu Fish que dans le tampon phosphate, uniquement pour des températures inférieures à 56,7°C.

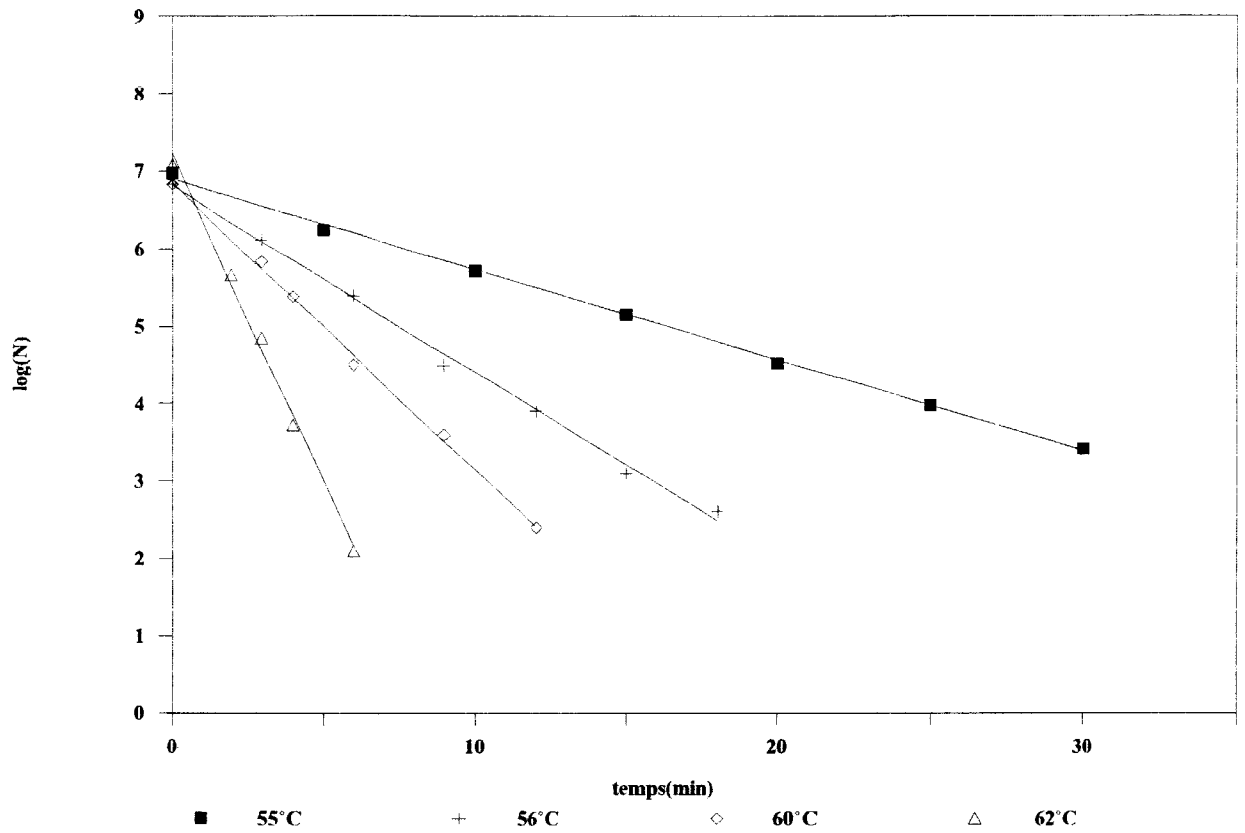
Les temps de réduction décimale à 60°C, déterminés à partir des courbes de TDT, sont de 2,1 minutes dans le tampon phosphate et 1,56 minute dans le milieu Fish.

MULAK, 1990, a étudié la thermorésistance de cette souche dans le tampon phosphate, dans le lieu noir et dans la terrine de poisson, elle a obtenu des valeurs  $D_{60}$  de 0,7 minute dans le tampon phosphate, de 0,3 minute dans du lieu noir et de 1 minute dans la terrine, valeurs inférieures à celles obtenues ici., Elle a également obtenu des valeurs de z inférieures : 5,7°C dans du tampon phosphate, 4°C dans du lieu noir et 5°C dans la terrine.

HANNA et al., 1977, ont étudié la survie de *Yersinia enterocolitica* dans du lait écrémé. Ils ont obtenu des valeurs voisines des celles obtenues ici et ils ont constaté qu'il suffit de 3 minutes à 60°C pour éliminer toute la population de *Yersinia enterocolitica*.

FRANCIS et al., 1980, ont étudié 21 souches de *Yersinia enterocolitica* et des espèces apparentées dans du lait, ils ont obtenu des valeurs comprises entre 0,7 et 17,0 secondes pour réduire de 90 % la population à 62,8°C.

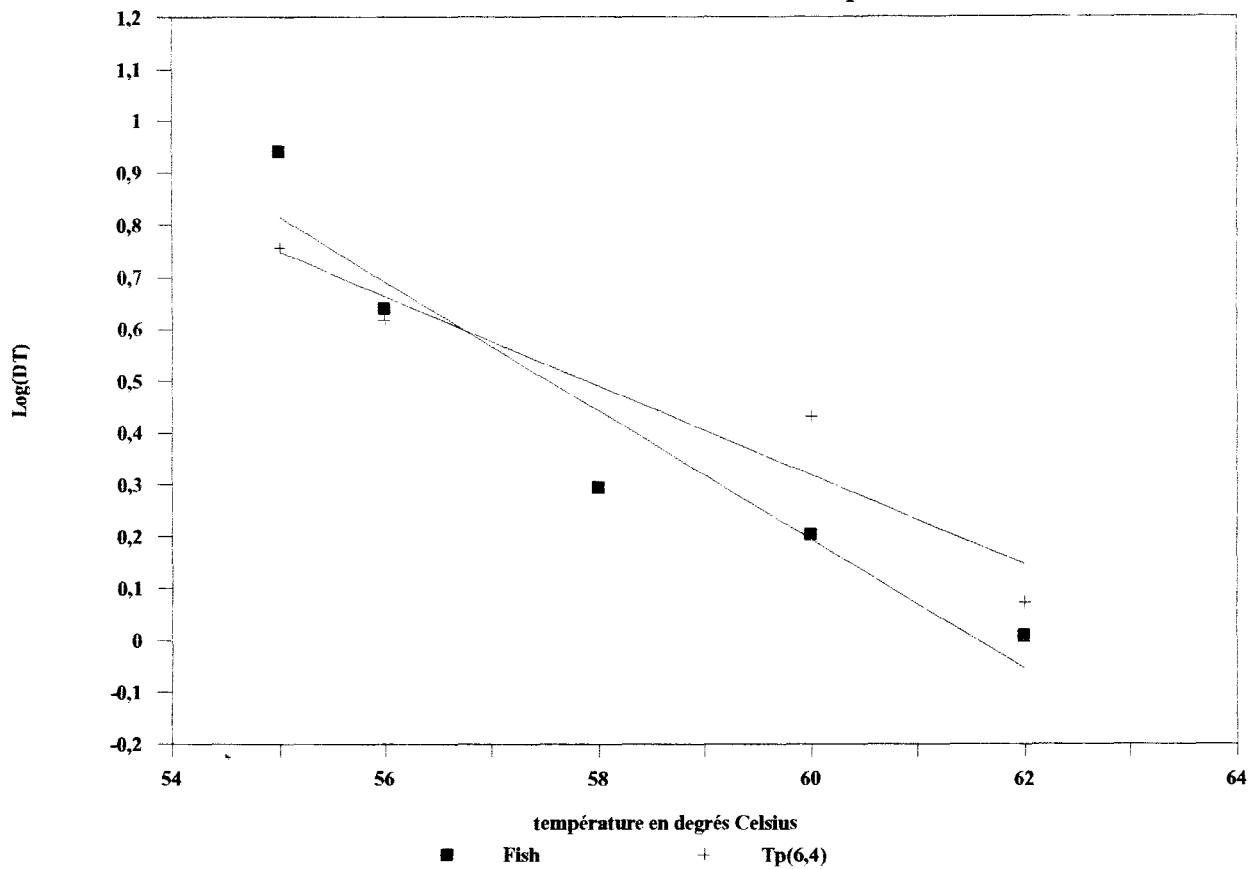
**Figure III.26 : *Yersinia enterocolitica* I**  
**Courbes de survie dans le tampon phosphate.**



température (°C)	m	r	a	b	$D_T$ (min)
55	14	0,999	-0,1749	6,897	5,7
56	14	0,996	-0,24083	6,806	4,2
60	12	0,998	-0,37085	6,865	2,7
62	10	0,994	-0,8458	7,226	1,2

**Tableau III.38 : Données statistiques des courbes de survie**  
**de *Yersinia enterocolitica* I dans le tampon phosphate.**

**Figure III.27 : *Yersinia enterocolitica* 1**  
**Courbes de destruction thermique.**

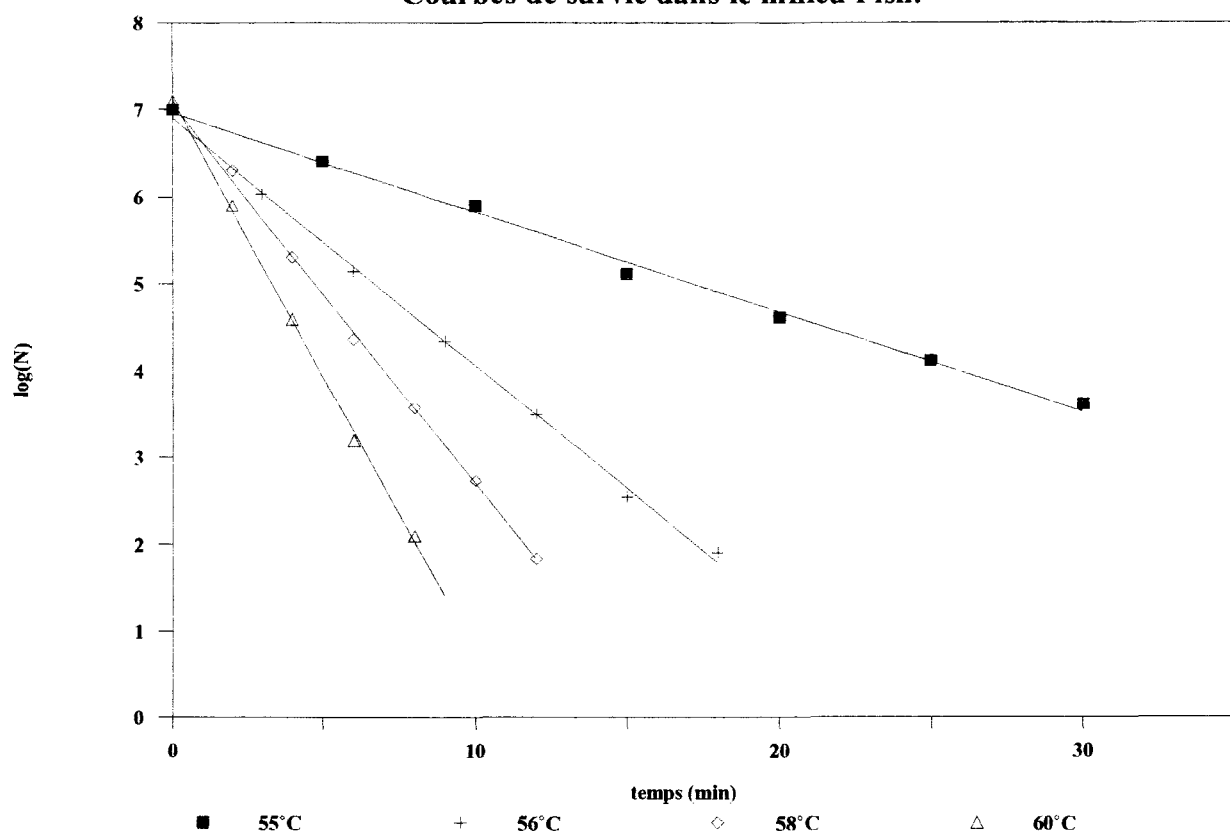


milieu	m	r	a	b	z (°C)
<b>Fish</b>	5	0,920	-0,12426	7,650	8
<b>Tampon phosphate</b>	4	0,924	-0,08623	5,493	11,6

**Tableau III.39 : Données statistiques de destruction thermique de *Yersinia enterocolitica* 1 dans les différents milieux.**



**Figure III.28 : *Yersinia enterocolitica* 2  
Courbes de survie dans le milieu Fish.**



température (°C)	m	r	a	b	$D_T$ (min)
55	14	0,996	-0,115	6,966	8,7
56	14	0,998	-0,284	6,904	3,5
58	12	0,998	-0,436	7,062	2,3
60	10	0,999	-0,635	7,116	1,6

**Tableau III.40 : Données statistiques des courbes de survie de *Yersinia enterocolitica* 2 dans le milieu Fish.**

### 3.b.- *Yersinia enterocolitica* 2

Les résultats de l'étude du traitement thermique de *Yersinia enterocolitica* 2 sont donnés figures III.28 à 30 et tableaux III.40 à 42.

Les survivants ont été dénombrés sur milieu Fish. L'incubation a été réalisée à 37°C pendant 72 heures.

Les valeurs de  $z$  de *Yersinia enterocolitica* 2 ne diffèrent pas significativement, pour le risque 5%, dans les deux milieux (annexe V).  $z$  est légèrement plus élevé dans le milieu Fish ( $z=7,4^{\circ}\text{C}$ ) que dans le tampon phosphate ( $z =7^{\circ}\text{C}$ ). *Yersinia enterocolitica* 2 est plus thermorésistant dans le tampon phosphate que dans le milieu Fish.

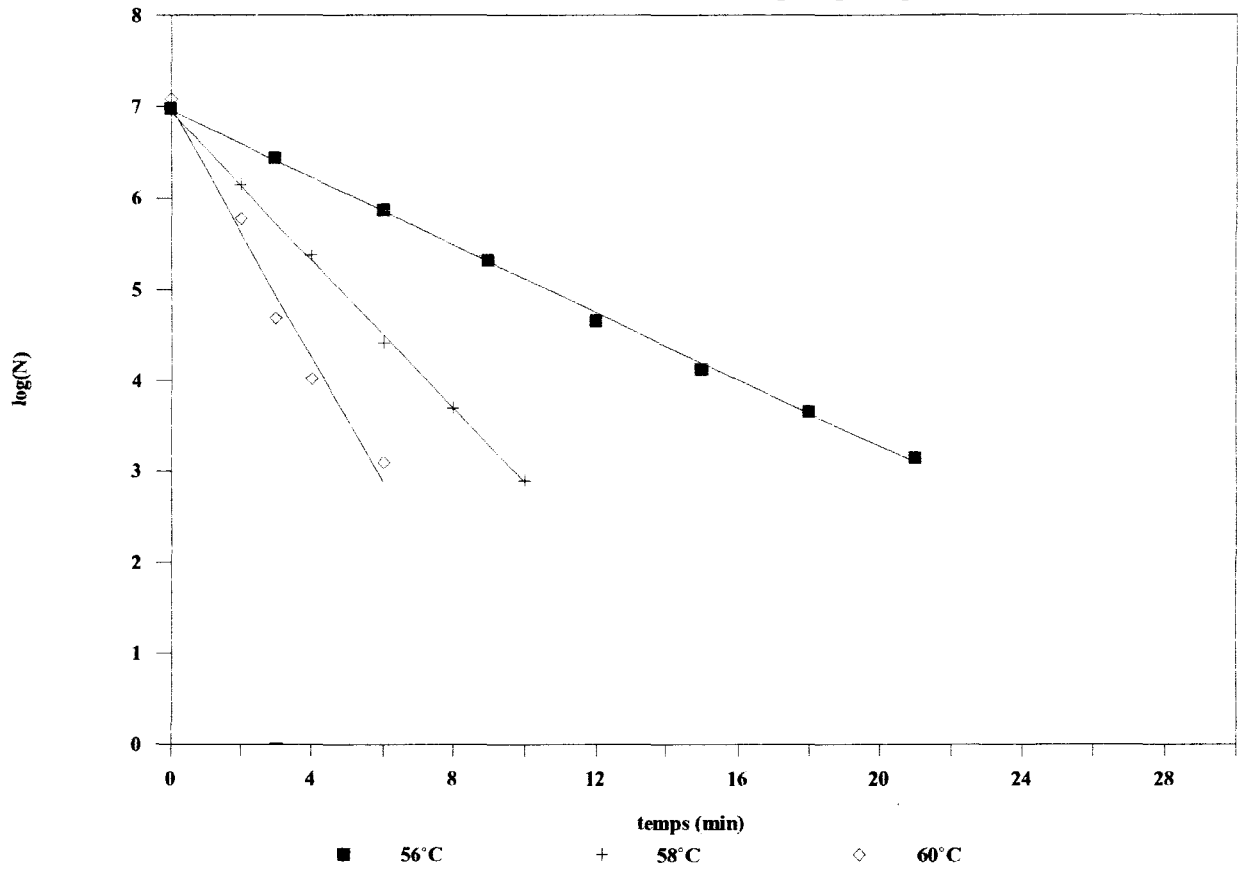
Les temps de réduction décimale à 60°C, déterminés à partir des courbes de TDT sont de 1,4 minute dans le tampon phosphate et de 1 minute dans le milieu Fish. Les valeurs de  $z$  sont les suivantes : 7°C dans le tampon phosphate et 7,2°C dans le milieu Fish.

MULAK, 1990, a obtenu le même résultat pour cette souche dans la terrine de poisson ( $D_{60} = 1$  minute), par contre ses valeurs de  $z$  sont inférieures : elles sont comprises entre 4 et 5,7°C.

MERGUI et al., 1985, ont étudié la thermorésistance de 10 souches de *Yersinia enterocolitica* et d'espèces apparentées dans du lait UHT écrémé, ils ont obtenu des valeurs de taux de réduction décimale à 58°C comprises entre 1 et 10 minutes, concordant avec celles trouvées ici ( 3 et 7,94 minutes).

Pour *Yersinia enterocolitica* 1,  $D_{60}$  est de 1,6 minute dans le milieu Fish et de 2,7 minutes dans le tampon phosphate, alors que pour *Yersinia enterocolitica* 2, ces valeurs sont égales dans les deux milieux, soit 1,6 minute. La comparaison de ces résultats montre bien que *Yersinia enterocolitica* 1 est légèrement plus résistante que *Yersinia enterocolitica* 2, mais seulement dans le tampon phosphate.

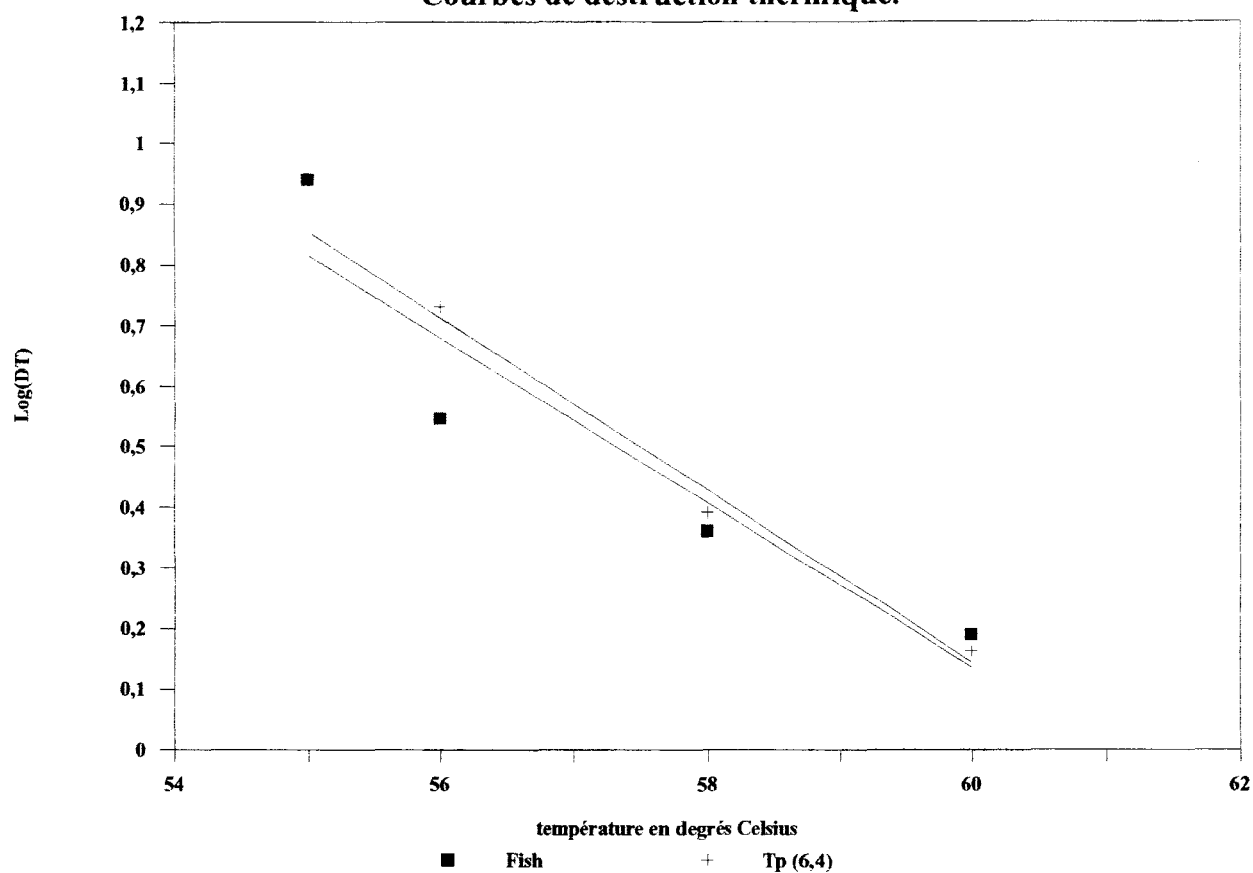
**Figure III.29 : *Yersinia enterocolitica* 2**  
**Courbes de survie dans le tampon phosphate.**



température (°C)	m	r	a	b	D <sub>T</sub> (min)
56	16	0,999	-0,185	6,968	5,4
58	14	0,999	-0,406	6,941	2,4
60	10	0,980	-0,686	6,996	1,6

**Tableau III.41 : Données statistiques des courbes de survie de *Yersinia enterocolitica* 2 dans la tampon phosphate.**

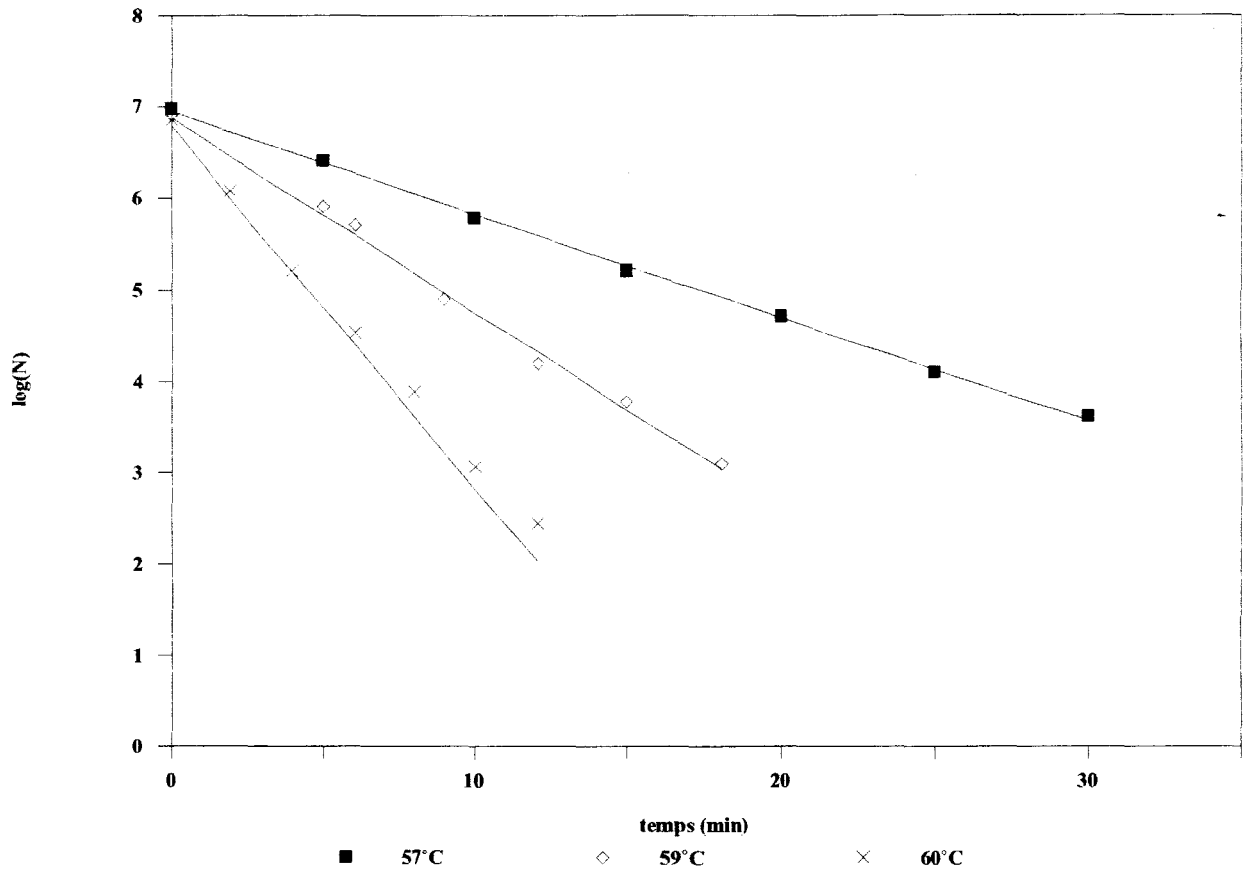
**Figure III.30 : *Yersinia enterocolitica* 2  
Courbes de destruction thermique.**



milieu	m	r	a	b	z (°C)
Fish	4	0,877	-0,13593	8,292	7,4
Tampon phosphate	3	0,987	-0,14205	8,668	7

**Tableau III.42 : Données statistiques de destruction thermique de *Yersinia enterocolitica* 2 dans les différents milieux.**

**Figure III.31 : *Micrococcus varians*  
Courbes de survie dans le milieu Fish.**



température (°C)	m	r	a	b	D <sub>T</sub> (min)
57	14	0,999	-0,113	6,953	8,9
59	14	0,994	-0,213	6,880	4,7
60	14	0,998	-0,367	6,790	2,7

**Tableau III.43 : Données statistiques des courbes de survie  
de *Micrococcus varians* dans le milieu Fish.**



#### 4.- *Micrococcus varians*

Les résultats de l'étude du traitement thermique de *Micrococcus varians* sont donnés figures III. 31 à 33 et tableaux III. 43 à 45.

Les valeurs de  $z$  de *Micrococcus varians* ne diffèrent pas significativement pour le risque 5 %, ni dans le tampon phosphate ( $z = 4,7^{\circ}\text{C}$ ), ni dans le milieu Fish ( $z = 6^{\circ}\text{C}$ ) (Voir Annexe V).

La courbe de TDT obtenue dans le tampon phosphate est en dessous de celle obtenue dans le milieu Fish. *Micrococcus varians* est plus thermosensible dans le tampon phosphate que dans le milieu Fish.

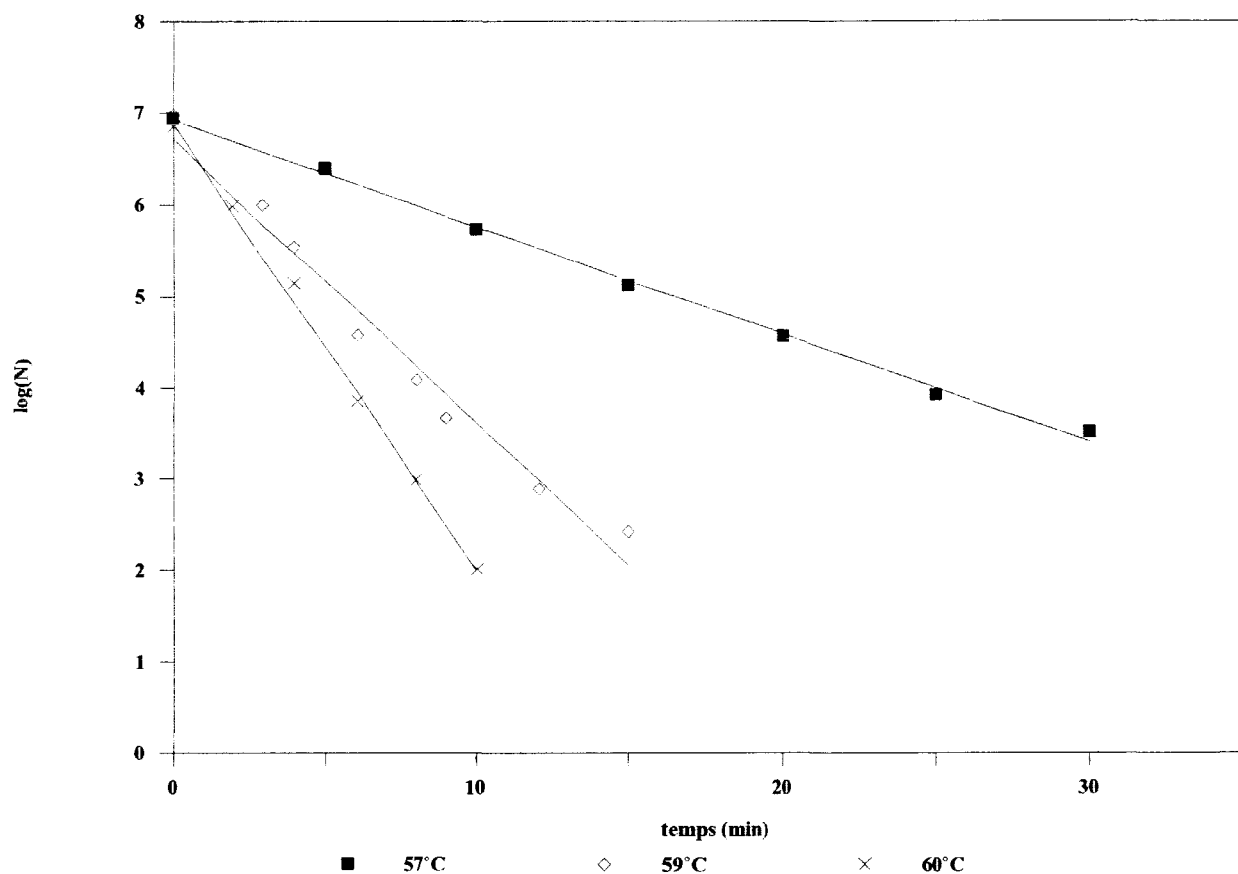
Les courbes de TDT obtenues dans le milieu Fish et le tampon phosphate se croisent à la température  $T = 55,97^{\circ}\text{C}$ . *Micrococcus varians* est donc plus thermorésistant dans le milieu Fish que dans le tampon phosphate aux températures strictement supérieures à  $55,97^{\circ}\text{C}$ .

Par ailleurs, à  $60^{\circ}\text{C}$ , il faut 2,7 minutes pour réduire de 90 % la population de *Micrococcus varians* dans le milieu Fish alors qu'il faut 2 minutes dans le tampon phosphate:  $D_T$  est donc plus faible dans le tampon phosphate que dans le milieu Fish.

Le temps de réduction décimale à  $60^{\circ}\text{C}$  est calculé à partir des courbes TDT, il est voisin de celui obtenu expérimentalement : 2,9 minutes dans le milieu Fish et 1,9 minutes dans le tampon phosphate.

MULAK, 1990, a étudié la thermorésistance de cette souche, elle a obtenu des valeurs de  $D_{60}$  supérieures à celles obtenues ici. Celles-ci étaient en effet de 4,9 minutes dans le tampon phosphate, de 8,2 minutes dans le lieu noir et de 11,8 minutes dans la terrine. Par contre, elle a trouvé des valeurs de  $z$  comprises entre  $4^{\circ}\text{C}$  et  $5,2^{\circ}\text{C}$ , qui sont inférieures.

**Figure III.32 : *Micrococcus varians*  
Courbes de survie dans le tampon phosphate.**

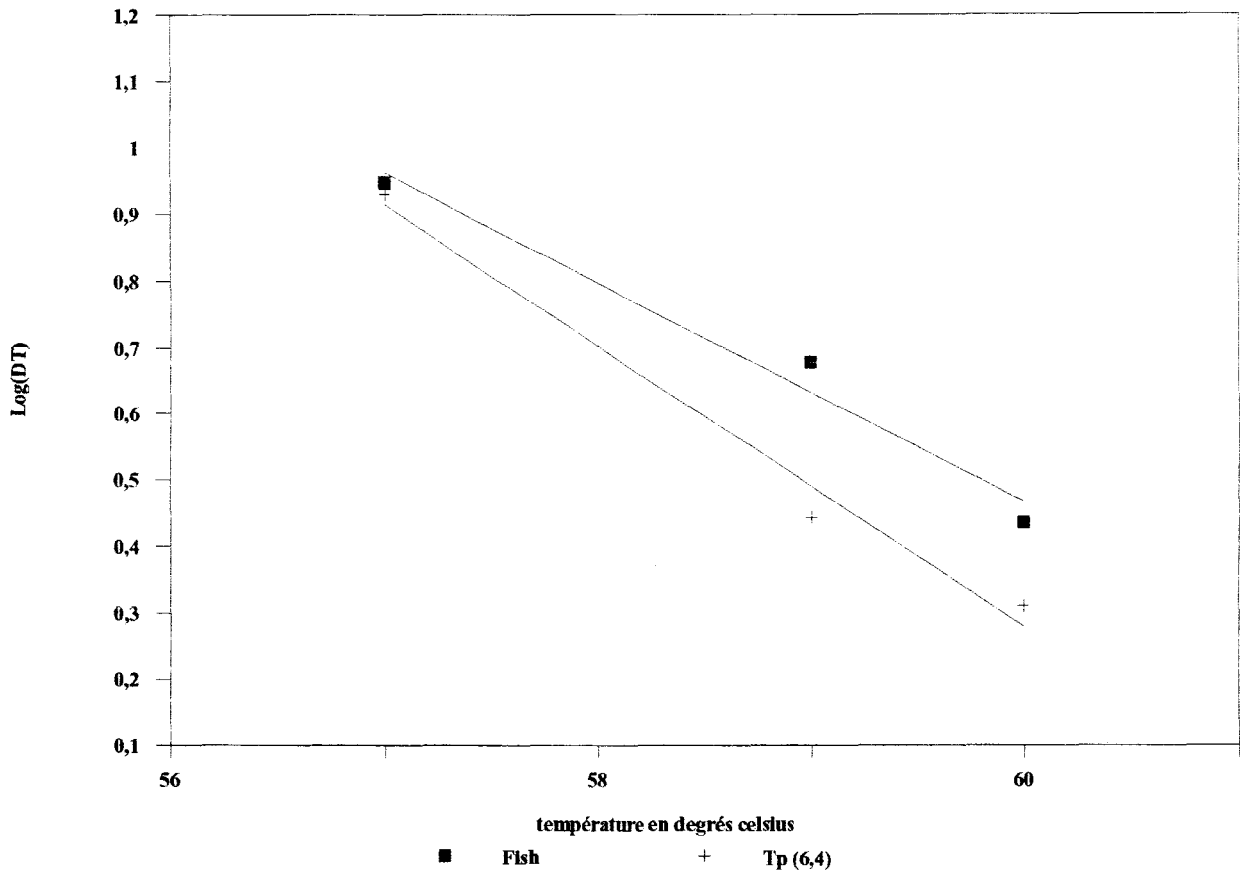


température (°C)	m	r	a	b	D <sub>T</sub> (min)
57	14	0,998	-0,117	6,931	8,5
59	16	0,978	-0,360	6,717	2,8
60	12	0,999	-0,490	6,888	2,0

**Tableau III.44 :Données statistiques des courbes de survie de  
*Micrococcus varians* dans le tampon phosphate.**



**Figure III.33 : *Micrococcus varians*  
Courbes de destruction thermique.**



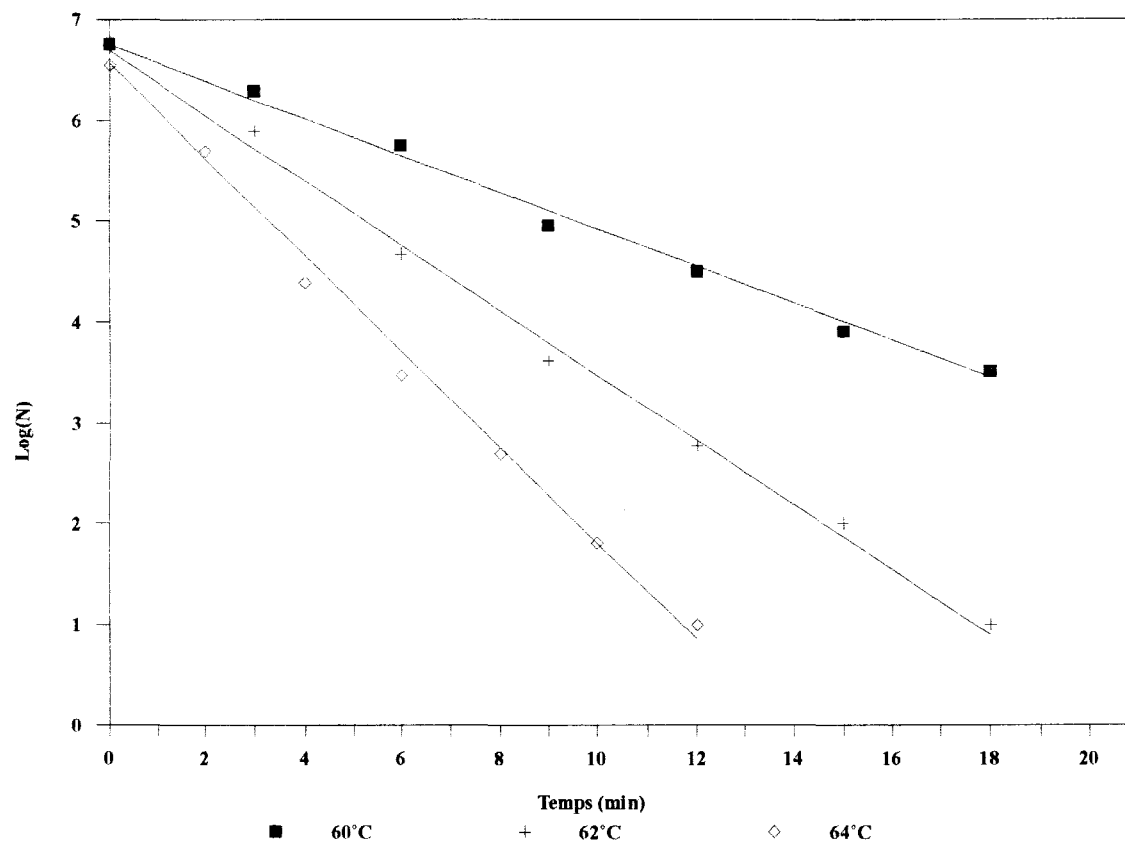
milieu	m	r	a	b	z (°C)
Fish	3	0,974	-0,16552	10,397	6
Tampon phosphate	3	0,984	-0,21193	12,995	4,7

**Tableau III.45 : Données statistiques de destruction thermique de *Micrococcus varians* dans les différents milieux.**





**Figure III.34 : *Pseudomonas paucimobilis*  
Courbes de survie dans le milieu Fish.**



température (°C)	m	r	a	b	$D_T$ (min)
60	14	0,995	-0,183	6,752	5,5
62	14	0,975	-0,322	6,692	3,1
64	14	0,985	-0,476	6,569	2,1

**Tableau III.46 : Données statistiques des courbes de survie de  
*Pseudomonas paucimobilis* dans le milieu Fish.**

## 5.- *Pseudomonas paucimobilis*

Les résultats de l'étude du traitement thermique de *Pseudomonas paucimobilis* sont notés figures III. 34 à 36 et tableaux III. 46 à 48.

Les valeurs de  $z$  de *Pseudomonas paucimobilis* diffèrent significativement pour le risque 5% dans les deux milieux (annexe V).  $z$  est plus élevé dans le milieu Fish ( $z = 9,6^{\circ}\text{C}$ ) que dans le tampon phosphate ( $z = 8^{\circ}\text{C}$ )

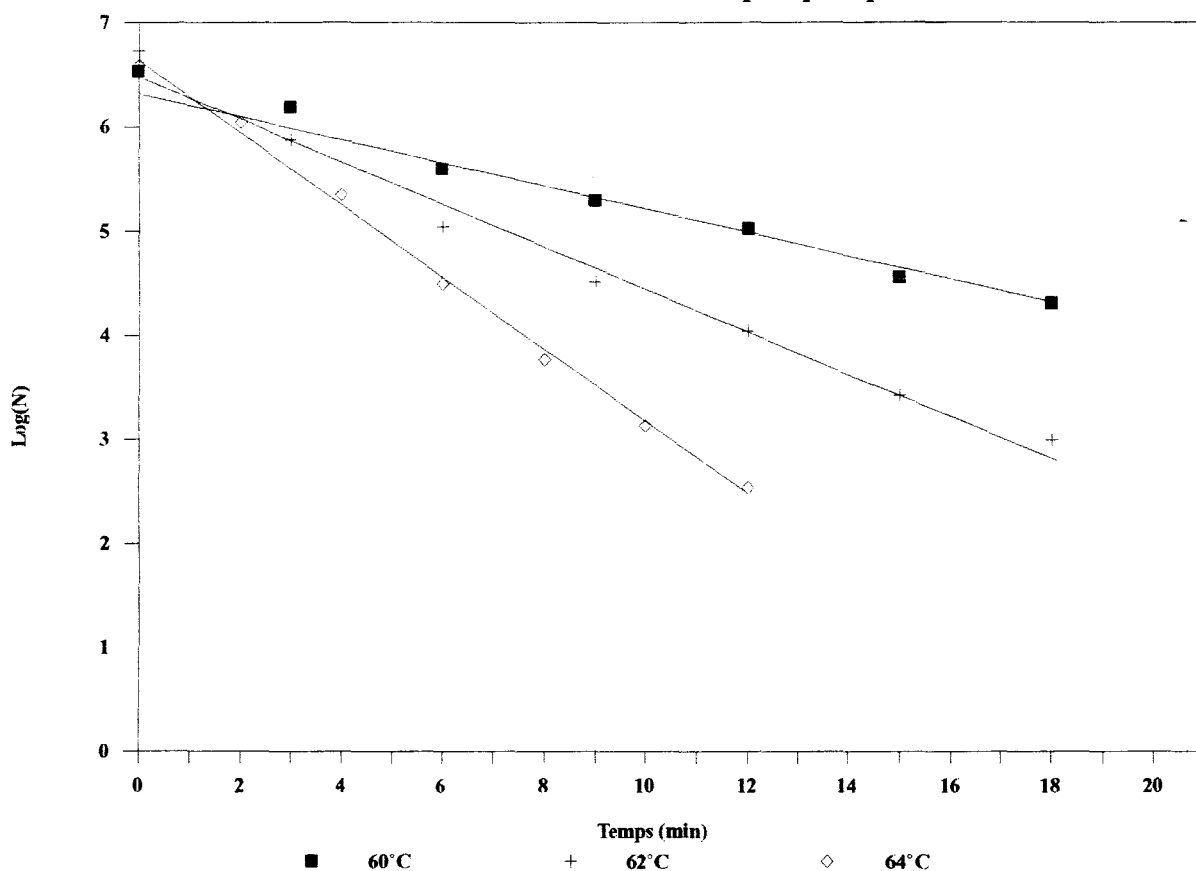
Sur la figure III.36, on voit que la courbe de TDT obtenue dans le milieu Fish est nettement en dessous de celle obtenue dans le tampon phosphate. Ceci signifie que le temps nécessaire pour réduire de 90% la population bactérienne est plus faible dans le milieu Fish que dans le tampon phosphate. *Pseudomonas paucimobilis* est donc plus thermorésistant dans le tampon phosphate que dans le milieu Fish, et ceci est vrai dans toutes les gammes de températures puisque les courbes de TDT qui ont des pentes différentes ne se croisent pas.

A  $64^{\circ}\text{C}$ , il faut 2,1 minutes pour réduire de 90 % la population de *Pseudomonas paucimobilis* dans le milieu Fish et il faut 2,9 minutes dans le tampon phosphate.

Le temps de réduction décimale à  $60^{\circ}\text{C}$  dans le milieu Fish est de 5,5 minutes alors qu'il est de 9,1 minutes dans le tampon phosphate (cette valeur a été calculée à partir des courbes de TDT). Ces résultats ne sont pas conformes aux travaux de ROZIER et al., 1985, qui ont considéré les *Pseudomonas* comme un micro-organisme thermosensible rapidement détruit à des températures inférieures à  $60^{\circ}\text{C}$  ( $1 \text{ min} < D_{55} < 4 \text{ min}$ )

MULAK, 1990, a étudié la thermorésistance de cette souche dans le lieu noir et la terrine de poisson, elle a obtenu des valeurs de  $D_{60}$  largement supérieures à celles trouvées ici. Elle a en effet obtenu 83,9 minutes dans le lieu noir et 41,2 minutes dans la terrine. Elle a par contre obtenu des valeurs de  $z$  proches de celles obtenues ici, ces valeurs sont comprises entre  $5,8$  et  $9,1^{\circ}\text{C}$ .

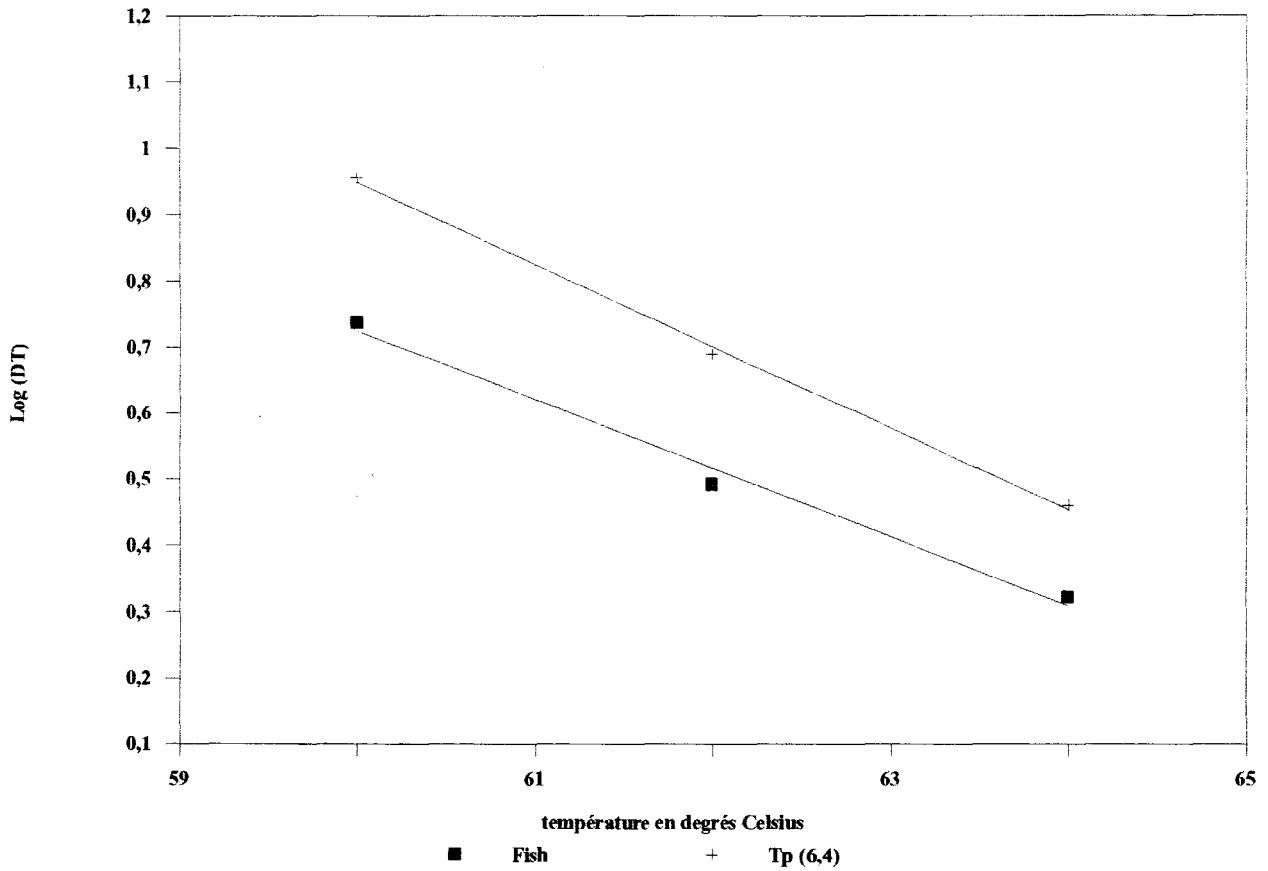
**Figure III.35 : *Pseudomonas paucimobilis*  
Courbes de survie dans le tampon phosphate.**



température (°C)	m	r	a	b	D <sub>T</sub> (min)
60	14	0,974	-0,111	6,321	9,1
62	14	0,978	-0,204	6,487	4,9
64	14	0,998	-0,347	6,640	2,9

**Tableau III.47 : Données statistiques des courbes de survie de  
*Pseudomonas paucimobilis* dans le tampon phosphate.**

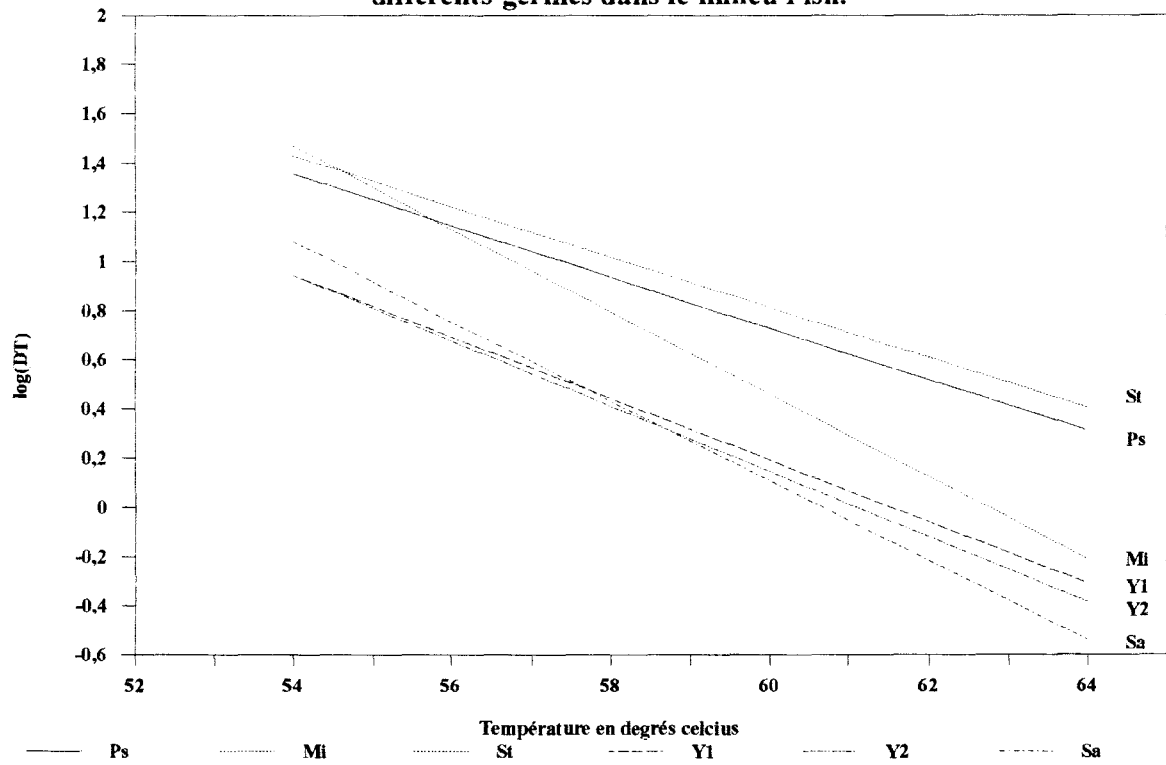
Figure III.36 : *Pseudomonas paucimobilis*  
 Courbes de destruction thermique.



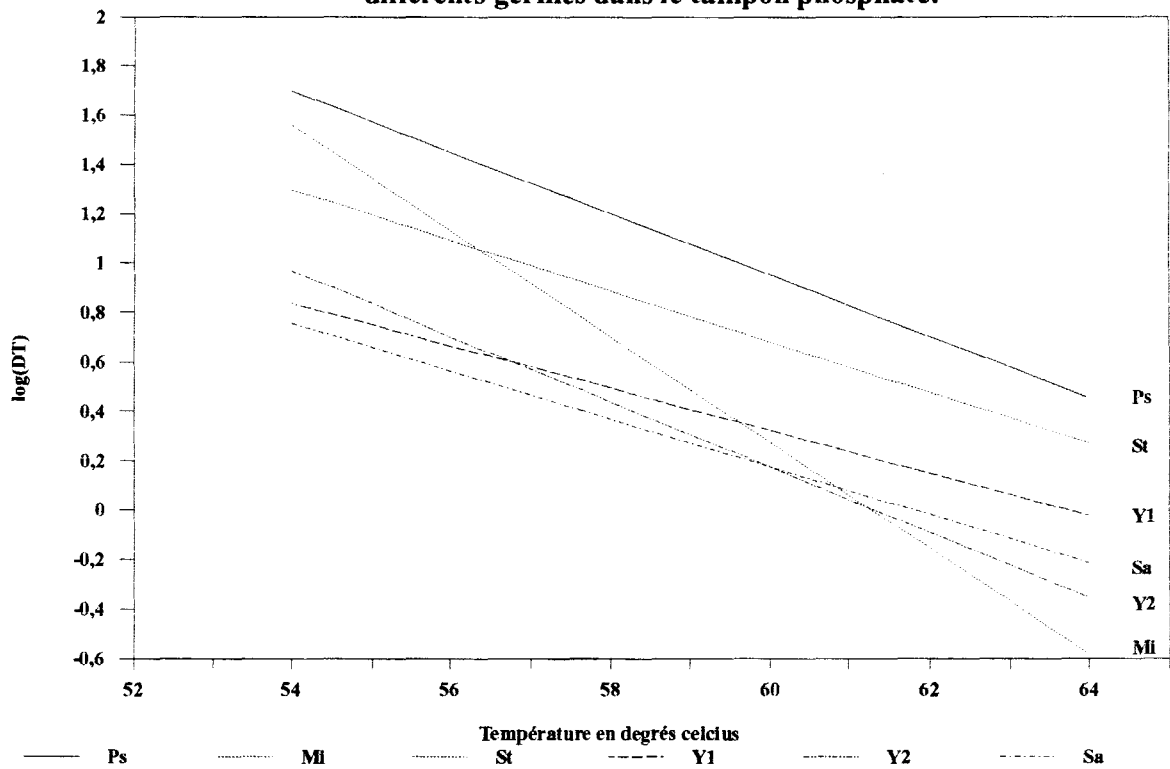
milieu	m	r	a	b	z (°C)
Fish	3	0,989	-0,10375	6,950	9,6
Tampon phosphate	3	0,998	-0,12375	8,374	8

Tableau III.48 : Données statistiques de destruction thermique  
 de *Pseudomonas paucimobilis* dans les différents milieux.

**Figure III.37 : Courbes de destruction thermique des différents germes dans le milieu Fish.**



**Figure III.38 : Courbes de destruction thermique des différents germes dans le tampon phosphate.**



## **6.- Commentaires et conclusion:**

La thermorésistance des bactéries varie en fonction des milieux dans lesquels ils sont chauffés (Figures III.37 & 38) :

*Pseudomonas paucimobilis* et *Yersinia enterocolitica* sont plus thermorésistants dans le tampon phosphate que dans le milieu Fish. Pour *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus varians*, la thermorésistance dans le milieu Fish est plus importante que dans le tampon phosphate.

Les valeurs de z (Tableau III 49) sont significativement plus faibles (au risque 5 %) dans le milieu Fish que dans le tampon phosphate pour *Yersinia enterocolitica 1* et *Staphylococcus aureus*. Pour les autres bactéries (*Pseudomonas paucimobilis*, *Micrococcus varians* et *Yersinia enterocolitica 2*), les valeurs sont plus élevées dans le milieu Fish.

Par ailleurs, on observe que les valeurs de z sont dispersées dans les deux milieux. En effet, dans le milieu Fish, elles varient entre 6 et 9,6°C, et dans le tampon phosphate, entre 4,7 et 11,6°C.

Ces résultats montrent qu' *Enterococcus faecium* est la bactérie la plus thermorésistante dans les gammes habituelles de température de pasteurisation (65 à 90°C). Ces résultats ne sont pas surprenants puisqu' *Enterococcus faecium* est connu pour sa thermorésistance élevée dans les produits carnés (MAGNUS et al., 1986; REICKERT et al., 1979), mais il faut noter que *Pseudomonas paucimobilis* montre également une grande résistance, proche de celle d'*Enterococcus faecium* à de telles températures.

D'après l'analyse de ces résultats, *Pseudomonas paucimobilis* possède aussi une thermorésistance élevée qui est proche de celle d' *Enterococcus faecium* et étant donné que *Pseudomonas paucimobilis* est un micro-organisme de contamination du poisson à l'état naturel, il est éventuellement possible de considérer ce dernier comme bactérie de référence pour la contamination.

	<i>Enterococcus faecium</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Yersinia enterocolitica 1</i>		<i>Yersinia enterocolitica 2</i>		<i>Micrococcus varians</i>		<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	
	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F
$D_T$ (min)	4,8	6,5	1,5	1,3	2,7	1,6	1,6	1,6	2	2,7	9,1	5,5
$z$ (°C)	9,6	9,6	10,3	6,2	11,6	8	7	7,4	4,7	6	8,1	9,6

Tableau n° : III. 49 Valeurs de  $D_{60}$  des différentes bactéries dans les 2 milieux.

(P : tampon phosphate, F : milieu Fish)

## **7.- Détermination des valeurs pasteurisatrices minimales à appliquer**

Les valeurs pasteurisatrices  $P_{Tréf}^z$  sont calculées à partir de la relation suivante :

$$P_{Tréf}^z = \log\left(\frac{N_0}{N}\right) \cdot D_{Tréf}$$

-z et  $D_{Tréf}$  sont les paramètres du micro-organisme considéré,

- $Tréf$  est la température à laquelle est défini le temps de réduction décimale,

- $\log(N_0 / N)$  est le taux de destruction.

La cuisson sous vide s'effectue à des températures comprises entre 65°C et 100°C (la majeure partie des plats cuisinés sont cuits à des températures comprises entre 65°C et 85°C), c'est à dire à des températures plus basses que pour les autres modes de cuisson, et parfois même à des températures inférieures à 65°C.

On a calculé les valeurs pasteurisatrices minimales à appliquer pour détruire les différentes bactéries étudiées dans le milieu Fish soluble.

Pour ce calcul, on a considéré 3 températures : 65°C comme température de référence pour la pasteurisation (OLHSON, 1978); 70°C comme température de référence officielle en France et 85°C comme température atteinte parfois dans certaines préparations.

Le calcul des valeurs pasteurisatrices a été effectué en tenant compte du niveau de contamination initial et du taux final de bactéries qu'il serait souhaitable d'atteindre dans les produits :

- pour les 2 bactéries *Enterococcus faecium* et *Pseudomonas paucimobilis* - qui pourraient être considérées comme des bactéries de référence -, on a considéré que dans les cas les plus défavorables, on pourrait avoir initialement  $10^5$  bactéries / g de produit, et qu'il faudrait  $10^{-5}$  bactéries / g en fin de cuisson.

- pour les 2 bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus* et *Yersinia enterocolitica*, on a considéré que dans les cas les plus défavorables, on pourrait avoir initialement  $10^4$  bactéries / g de produit; d'après les critères d'appréciation de l'état hygiénique des plats cuisinés, il faut moins de 30 bactéries au gramme de produit. Afin d'avoir une marge de sécurité, MULAK, 1990, a considéré que  $10^{-6}$  bactéries / g en fin de cuisson (soit 1 bactérie par tonne) était un indice satisfaisant du taux de destruction.



- pour *Micrococcus varians*, on a considéré que dans les cas défavorables, on pourrait avoir  $10^4$  bactéries /g et qu'il faudrait exiger  $10^{-5}$  bactéries / g après cuisson.

Les résultats du calcul des valeurs pasteurisatrices minimales à appliquer pour détruire les bactéries de contamination les plus représentatifs des plats cuisinés sous vide étudiés sont notés dans le tableau III.50.

	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica 1</i>	<i>Yersinia enterocolitica 2</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>
No	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$	$10^4$
N	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$
log(No/N)	9	10	10	10	9	9
D <sub>65</sub> (minutes)	1,95	0,20	0,374	0,286	0,435	1,61
D <sub>70</sub> (minutes)	0,59	0,031	0,09	0,06	0,065	0,487
D <sub>85</sub> (minutes)	0,016	0,00012	0,0012	0,0005	0,0002	0,014
z (°C)	9,6	6,2	8	7,4	6	9,6
$P_{65}^z$ (minutes)	17,55	2	3,75	2,86	3,915	14,49
$P_{70}^z$ (minutes)	5,31	0,31	0,9	0,6	0,585	4,383
$P_{85}^z$ (minutes)	0,144	0,0012	0,012	0,005	0,0018	0,126

**Tableau III.50** : Valeurs pasteurisatrices minimales déterminées dans le milieu Fish soluble à appliquer à 65°C, 70°C et 85°C.

D<sub>65</sub>, D<sub>70</sub> et D<sub>85</sub> ont été déduits des courbes de TDT déterminées précédemment.

Pour *Enterococcus faecium* et *Pseudomonas paucimobilis*, les valeurs pasteurisatrices calculées à 65°C sont 3 fois plus élevées que celles calculées à 70°C.

Pour *Staphylococcus aureus* et *Micrococcus varians*, les valeurs pasteurisatrices calculées à 65°C sont plus de 6 fois plus élevées que celles calculées à 70°C.

Enfin pour *Yersinia enterocolitica*, les valeurs pasteurisatrices sont au moins 4 fois plus élevées que celles calculées à 70°C.

Les valeurs pasteurisatrices à appliquer pour détruire *Enterococcus faecium* et *Pseudomonas paucimobilis* sont légèrement supérieures à celles à appliquer pour détruire les autres bactéries. En s'assurant de la destruction de ces deux bactéries les plus thermorésistantes, on devrait donc être assuré de la destruction de la quasi-totalité de tous les micro-organismes non sporulés pathogènes et responsables de l'altération.

Les valeurs pasteurisatrices calculées à 85°C sont au moins 100 fois plus faibles que les valeurs calculées à 65°C.

Cette recherche fondamentale de la thermorésistance a été effectuée dans un milieu liquide et non pas dans les aliments, où il pourrait y avoir un effet protecteur dû aux nombreuses réactions chimiques qui se produisent en modifiant l'environnement des bactéries (CERF et al., 1967).

Les conditions de chauffage réalisées grâce à ce dispositif ne paraissent pas se rapprocher assez fidèlement des conditions de pasteurisation utilisées dans l'industrie alimentaire, car dans les milieux liquides, le chauffage est presque instantané, alors que dans les plats cuisinés, la vitesse de pénétration de la température au coeur des produits dépend essentiellement de la nature et de la taille du produit.

D'après l'ensemble de ces résultats, pour être assuré de la destruction de la quasi-totalité des formes végétatives des bactéries, il faudrait appliquer une valeur pasteurisatrice minimale de  $P_{70}^{9,6} = 5,31$  minutes, c'est à dire qu'il faudrait 5,31 minutes à 70°C pour réduire la population au milliardième.

*Chapitre 3*

**ÉVOLUTION DE LA CROISSANCE DES  
BACTÉRIES DANS DES FILETS DE  
POISSON APRÈS TRAITEMENT  
THERMIQUE**

## *Chapitre 3*

### **EVOLUTION DE LA CROISSANCE DES BACTERIES DANS DES FILETS DE POISSON APRES TRAITEMENT THERMIQUE**

---

L'étude est réalisée sur des filets de lieu noir, inoculés par les mêmes bactéries sélectionnées. Un traitement à basse température (60°C) est effectué. La durée du traitement est choisie en fonction des résultats du traitement thermique (cf Chapitre 2) et elle est variable selon la thermorésistance de chaque bactérie.

Les suivis des expérimentations sont réalisés à +2°C et +7°C. Les analyses sont effectuées à intervalles réguliers et l'expérimentation est arrêtée après 4 semaines de conservation. Le choix de plus de 3 semaines (norme exigée pour conserver un produit cuit sous vide) est souvent demandé par les fabricants qui souhaitent avoir une durée de conservation plus longue. Pendant les 4 semaines de l'expérimentation, les analyses ont été effectuées à intervalles de 7 jours pour les lots conservés à 2°C et à intervalle de 4 jours pour les lots conservés à 7°C. L'évolution du pH a été mesurée lors de l'analyse des échantillons.

L'exploitation totale des résultats de croissance aux températures de 2°C et 7°C est effectuée sous forme de tableaux résumés et d'histogrammes :

- dans chaque tableau, on a noté les valeurs du pH, la température de conservation et le temps nécessaire pour atteindre les concentrations de  $3 \cdot 10^5$  bactéries / g et de  $3 \cdot 10^6$  bactéries /g dans les lots traités (ce qui correspond aux filets pasteurisés) et dans les lots témoins (correspondant aux filets non pasteurisés).

- dans chaque figure, on a donné deux histogrammes : l'un correspond à l'évolution de la contamination dans un échantillon témoin (qui n'a pas subi de traitement thermique à 60°C), l'autre correspond à l'évolution de la flore après traitement thermique à 60°C.

Les dénombrements sont effectués sur le milieu sélectif approprié.

## I.- QUALITE INITIALE DES FILETS AVANT TRAITEMENT

Les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les filets de lieu noir sont notés dans le tableau n° III.51

Tableau n° III.51 : Résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les filets de lieu noir.

ANALYSES	échantillon n° 1	échantillon n°2
FLORE AEROBIE MESOPHILE TOTALE (/ g)	< 5	< 5
FLORE AEROBIE PSYCHROTROPHE (/ g)	< 50	< 50
COLIFORMES (/ g)	< 5	< 5
STREPTOCOQUES FECAUX (/ g)	0	0
MICROCOQUES STAPHYLOCOQUES (/ g)	0	0
ANAEROBIES SULFITO REDUCTEURS (/ g)	0	0

Les résultats montrent bien que la qualité initiale des filets est satisfaisante pour les expérimentations et que ces produits ne contiennent pratiquement pas de bactéries de contamination.

## II.- EVOLUTION QUANTITATIVE DE LA CONTAMINATION BACTERIENNE AU COURS DU TEMPS

La concentration des inoculums correspondant aux souches étudiées est similaire pour les lots témoins et pour les lots traités étudiés au début de la conservation :

- concentration au départ voisine de  $10^6$  bactéries /g de chair pour les échantillons avant traitement thermique (le traitement thermique devrait ramener le niveau de cette microflore entre  $10^3$  et  $10^4$  par g);

- pour les échantillons non traités (témoins), cette concentration est comprise entre  $5 \cdot 10^3$  et  $10^4$  bactéries / g.

Le pH des échantillons augmente au cours de la conservation (annexe VI); on a souhaité une concentration de  $10^3$  bactéries / g au départ avant conservation et c'est la raison pour laquelle on a choisi des temps de traitement thermique adéquats selon chaque bactérie. Pour contrôler la qualité microbiologique des filets, l'évolution de la flore totale aérobie mésophile est suivie dans les filets pasteurisés.

Pour exploiter les résultats et comparer l'influence de la température de conservation et du pH de la préparation sur le développement des bactéries étudiées, on a repéré sur chaque profil d'évolution :

- le temps nécessaire pour que les échantillons analysés aient une concentration bactérienne égale à  $3 \cdot 10^5$  bactéries / g (norme de l'arrêté du 21 décembre 1979, soit  $< 3 \cdot 10^5$  bactéries / g);

- le temps nécessaire pour que les échantillons analysés aient une concentration totale au moins égale à  $3 \cdot 10^6$  bactéries / g (la zone comprise entre  $3 \cdot 10^5$  et  $3 \cdot 10^6$  bactéries / g est le seuil d'acceptation sur le plan réglementaire).

Ces limites sont celles préconisées pour la flore totale aérobie-anaérobie de contamination des plats cuisinés à l'avance.

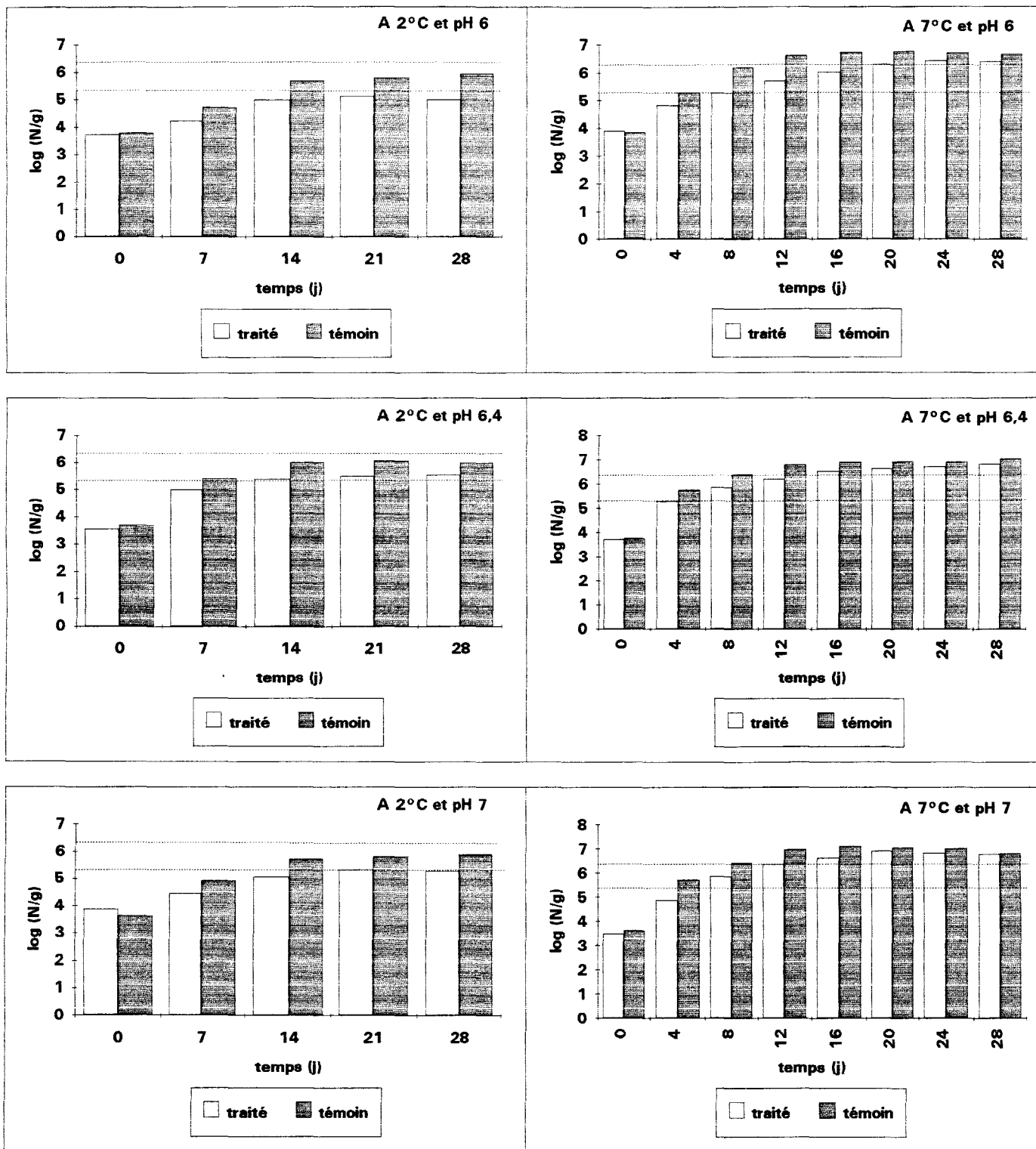


Figure n° III.39 : Evolution de la contamination par *Enterococcus faecium*, en fonction du pH et de la température, dans un échantillon de lieu noir ayant subi un traitement thermique à 60°C pendant 20 minutes, et un échantillon témoin n'ayant pas subi ce traitement.



**a.- Enterococcus faecium**

Le traitement thermique est appliqué aux lots de chair de lieu noir initialement contaminés avec une population initiale de  $2,7 \cdot 10^6$  bactéries / g. Après 20 minutes de traitement à 60°C, la population initiale passe à  $5 \cdot 10^3$  bactéries / g, et la concentration d'*Enterococcus faecium* dans les filets non pasteurisés est d'environ  $7 \cdot 10^3$  bactéries / g. Le dénombrement est effectué sur milieu B.E.A.. L'ensemble des résultats est la moyenne entre 2 expérimentations indépendantes d'un même lot.

Tableau III.52 : Nombre de jours de conservation à 2°C et 7°C pour obtenir en moyenne  $3 \cdot 10^5$  et  $3 \cdot 10^6$  bactéries / g dans des filets de lieu noir pasteurisés et non pasteurisésensemencés avec *Enterococcus faecium*.

<i>Enterococcus faecium</i>	2°C		7°C	
	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^5$	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^6$	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^5$	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^6$
pH 6				
filets non pasteurisés	12	> 28	4	9
filets pasteurisés	> 28	> 28	8	20
pH 6,4				
filets non pasteurisés	7	> 28	3	8
filets pasteurisés	14	> 28	4	14
pH 7				
filets non pasteurisés	10	> 28	3,5	8
filets pasteurisés	21	> 28	6	12

On rappelle que "lot témoin" correspond aux filets non pasteurisés et "lot traité" correspond aux filets pasteurisés.

Bien évidemment, la multiplication bactérienne est beaucoup moins rapide à 2°C. Pour les lots témoins, comme pour les lots traités, il faut 2 fois plus de temps à 2°C qu'à 7°C pour que tous les échantillons atteignent une concentration totale au moins égale à  $3 \cdot 10^5$  bactéries / g. A 2°C comme à 7°C, l'évolution de la contamination est environ 2 fois plus rapide dans les échantillons témoins que dans les échantillons traités (tableau III. 52), cette différence étant selon toute évidence liée au traitement thermique.



A pH 6,4, l'évolution de la contamination est plus rapide qu'à pH 7 et qu'à pH 6. A pH 6 et à 2°C, s'il faut 12 jours pour que l'échantillon témoin atteigne  $3.10^5$  bactéries / g, l'échantillon traité n'a jamais dépassé cette concentration pour la durée de 28 jours (Figure III.39). La baisse de la température et la variation du pH sont responsables du ralentissement de la croissance.

A 2°C, dans aucun lot il n'a été dénombré plus de  $3.10^6$  bactéries / g sur la période d'expérimentation. Par contre, à 7°C,  $3.10^6$  bactéries / g est atteint au maximum en 20 jours.

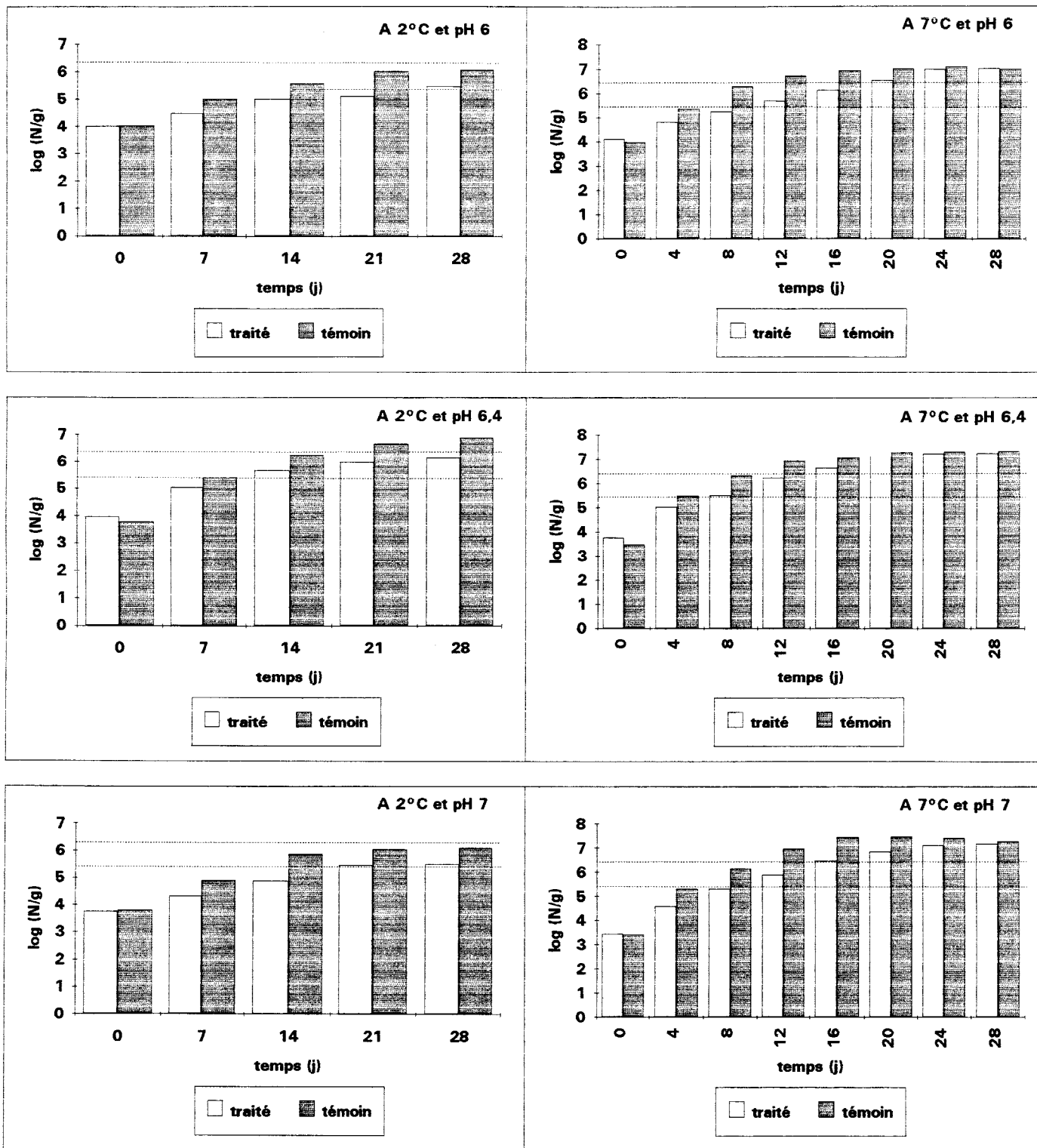


Figure n° III.40 : Evolution de la contamination par *Staphylococcus aureus*, en fonction du pH et de la température, dans un échantillon de lieu noir ayant subi un traitement thermique à 60°C pendant 10 minutes, et un échantillon témoin n'ayant pas subi ce traitement.



**b.- Staphylococcus aureus**

Le traitement thermique appliqué aux lots de chair de lieu noir contaminés avec *Staphylococcus aureus* est de 10 minutes à 60°C.

La population initiale de l'inoculum après traitement passe à des concentrations voisines de  $10^4$  bactéries / g. Le dénombrement est effectuée sur milieu Chapman.

Tableau III.53 : Nombre de jours de conservation à 2°C et 7°C pour obtenir en moyenne  $3.10^5$  et  $3.10^6$  bactéries / g dans des filets de lieu noir pasteurisés et non pasteurisés ensemencés avec *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>	2°C		7°C	
	temps en jours pour obtenir $3.10^5$	3.10 <sup>6</sup>	temps en jours pour obtenir $3.10^5$	3.10 <sup>6</sup>
pH 6				
filets non pasteurisés	14	> 28	4	11
filets pasteurisés	28	> 28	10	20
pH 6,4				
filets non pasteurisés	7	21	4	8
filets pasteurisés	12	> 28	8	13
pH 7				
filets non pasteurisés	11	> 28	4	9
filets pasteurisés	21	> 28	8	16

L'analyse des résultats de *Staphylococcus aureus* montre comme précédemment qu'à pH 6,4, l'évolution de la contamination est plus rapide. Par ailleurs, aucun des lots conservés à 2°C n'atteint une concentration de  $3.10^6$  bactéries / g pendant la période fixée pour l'expérimentation, sauf le lot non pasteurisé à pH 6,4. Par contre tous les lots conservés à 7°C dépassent cette concentration, mais dans des temps variant entre 8 et 20 jours (tableau III.53)

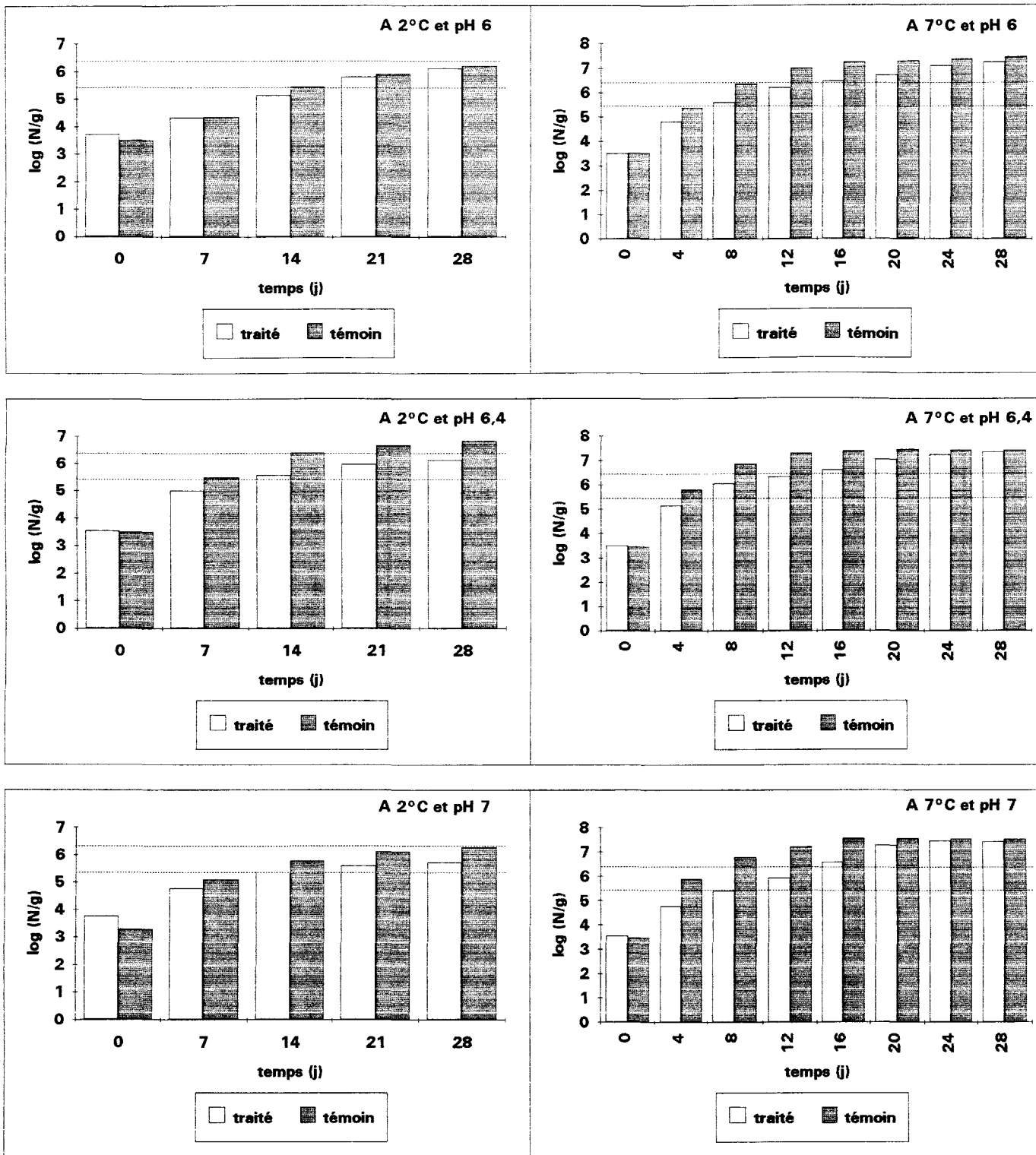


Figure n° III.41 : Evolution de la contamination par *Yersinia enterocolitica* 1, en fonction du pH et de la température, dans un échantillon de lieu noir ayant subi un traitement thermique à 60°C pendant 14 minutes, et un échantillon témoin n'ayant pas subi ce traitement.



**c.- Yersinia enterocolitica 1**

Le traitement thermique est appliqué aux lots de chair de lieu noir initialement contaminés avec une population initiale d'environ  $3,5 \cdot 10^6$  bactéries / g. Après 14 minutes de traitement à 60°C, la population initiale passe à environ  $5 \cdot 10^3$  bactéries / g; le dénombrement est effectué sur milieu C.I.N.

L'ensemble des résultats est la moyenne entre 2 expérimentations indépendantes d'un même lot. Ces évolutions de contamination sont suivies en fonctions du temps, de la température de conservation et du pH de l'échantillon.

Tableau III.54 : Nombre de jours de conservation à 2°C et 7°C pour obtenir en moyenne  $3 \cdot 10^5$  et  $3 \cdot 10^6$  bactéries / g dans des filets de lieu noir pasteurisés et non pasteurisésensemencés avec *Yersinia enterocolitica 1*.

<i>Yersinia enterocolitica 1</i>	2°C		7°C	
	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^5$	3.10 <sup>6</sup>	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^5$	3.10 <sup>6</sup>
pH 6				
filets non pasteurisés	14	> 28	4	8
filets pasteurisés	17	> 28	7,5	16
pH 6,4				
filets non pasteurisés	7	17	3,5	7
filets pasteurisés	13	> 28	6	12
pH 7				
filets non pasteurisés	11	23	3	6
filets pasteurisés	14	> 28	8	15

On a fait les mêmes observations que précédemment pour les deux souches étudiées, à savoir que l'évolution est plus lente pour les lots traités, quelle que soit la température de conservation, et que la multiplication est plus rapide à pH 6,4, tandis qu'à pH 6, la multiplication est ralentie. Cependant, et pour la première fois, les lots témoins aux pH 6,4 et 7 dépassent la concentration de  $3 \cdot 10^6$  bactéries / g, alors que le lot témoin à pH 6 ne l'atteint pas et qu'aucun des échantillons traités ne dépasse non plus cette concentration (figure III.41). Cette capacité de développement est vraisemblablement liée au caractère psychrotrophe de la bactérie.

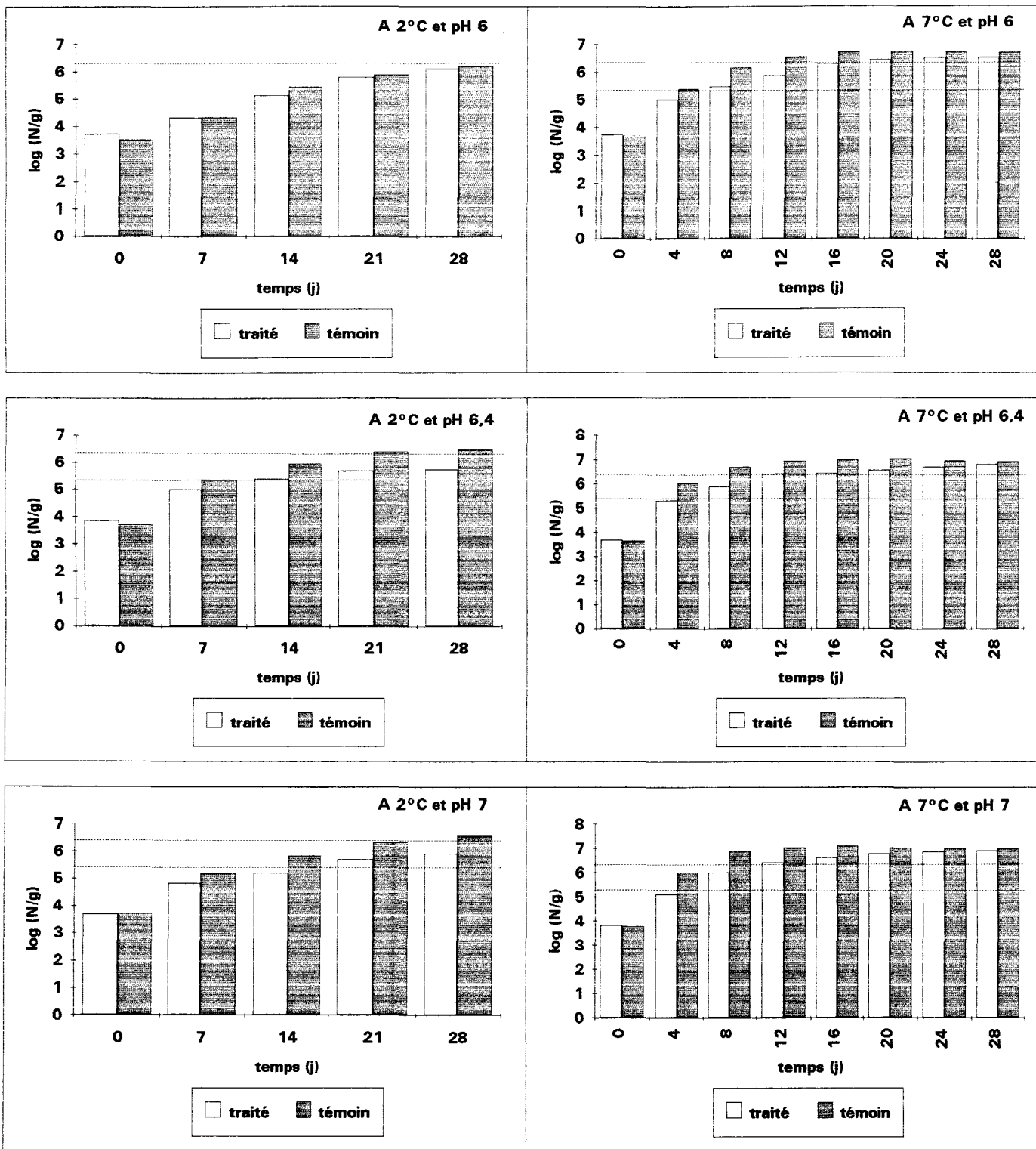


Figure n° III.42 : Evolution de la contamination par *Yersinia enterocolitica* 2, en fonction du pH et de la température, dans un échantillon de lieu noir ayant subi un traitement thermique à 60°C pendant 14 minutes, et un échantillon témoin n'ayant pas subi ce traitement.



d.- *Yersinia enterocolitica 2.*

Le traitement thermique appliqué aux lots de chair hachée de lieu noir préalablement inoculés par  $2,3 \cdot 10^6$  bactéries / g est de 14 min. Après ce traitement, l'inoculum est de l'ordre de  $6$  à  $8 \cdot 10^3$  bactéries / g, le dénombrement est effectué sur un milieu sélectif de *Yersinia enterocolitica* (milieu C.I.N.).

Deux expérimentations indépendantes sont menées et l'ensemble des résultats est la moyenne entre ces 2 expérimentations d'un même lot.

Tableau III.55 : Nombre de jours de conservation à 2°C et 7°C pour obtenir en moyenne  $3 \cdot 10^5$  et  $3 \cdot 10^6$  bactéries / g dans des filets de lieu noir pasteurisés et non pasteurisés ensemencés avec *Yersinia enterocolitica 2.*

<i>Yersinia enterocolitica 2</i>	2°C		7°C	
	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^5$	3.10 <sup>6</sup>	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^5$	3.10 <sup>6</sup>
pH 6				
filets non pasteurisés	11	28	4	10
filets pasteurisés	21	> 28	8	16
pH 6,4				
filets non pasteurisés	7	21	3	6
filets pasteurisés	12	>28	4,5	12
pH 7				
filets non pasteurisés	10	22	3	7
filets pasteurisés	17	> 28	5	12

Si le comportement général de *Yersinia enterocolitica 2* est voisin des autres bactéries étudiées précédemment et surtout de *Yersinia enterocolitica 1*, il faut seulement signaler que même à pH 6, les lots témoins, à 2°C, atteignent la concentration de  $3 \cdot 10^6$  bactéries / g, mais en 27 jours (figure III.42).

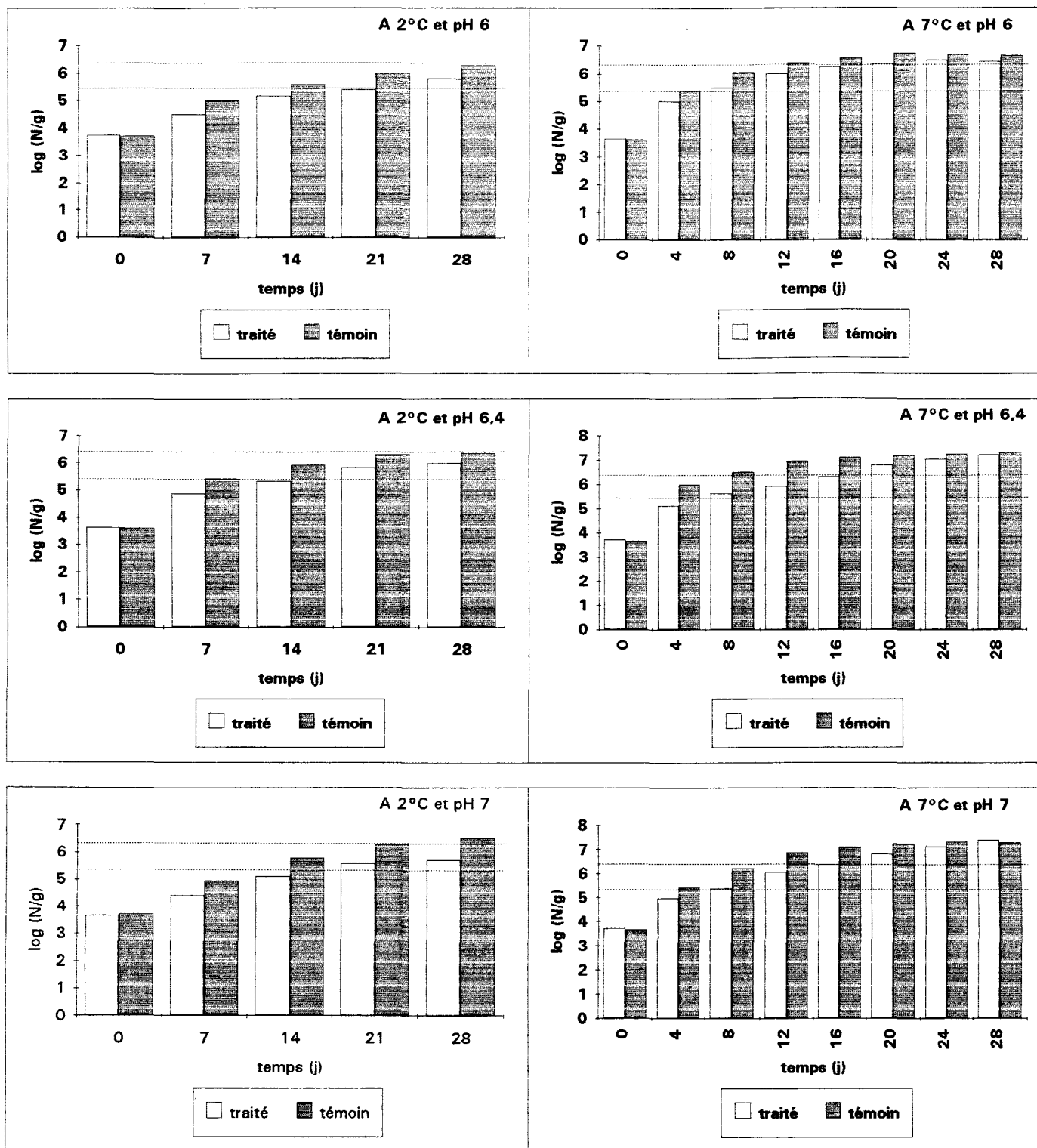


Figure n° III.43 : Evolution de la contamination par *Micrococcus varians*, en fonction du pH et de la température, dans un échantillon de lieu noir ayant subi un traitement thermique à 60°C pendant 17 minutes, et un échantillon témoin n'ayant pas subi ce traitement.



**e.- *Micrococcus varians***

On applique aux lots de chair de poisson de lieu noir, préalablement contaminés par une concentration de  $2,1 \cdot 10^6$  bactéries / g, un traitement thermique de  $60^\circ\text{C}$  pendant 17 minutes. Après traitement thermique, la population survivante dénombrée sur milieu Chapman est voisine de  $4,5 \cdot 10^3$  bactéries / g. L'ensemble des résultats est la moyenne entre 2 expérimentations indépendantes d'un même lot.

Tableau III.56 : Nombre de jours de conservation à  $2^\circ\text{C}$  et  $7^\circ\text{C}$  pour obtenir en moyenne  $3 \cdot 10^5$  et  $3 \cdot 10^6$  bactéries / g dans des filets de lieu noir pasteurisés et non pasteurisés ensemencés avec *Micrococcus varians*.

<i>Micrococcus varians</i>	$2^\circ\text{C}$		$7^\circ\text{C}$	
	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^5$	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^6$	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^5$	temps en jours pour obtenir $3 \cdot 10^6$
pH 6				
filets non pasteurisés	13,5	28	4	12
filets pasteurisés	21	> 28	8	21
pH 6,4				
filets non pasteurisés	7	21	3	8
filets pasteurisés	14	> 28	7	16
pH 7				
filets non pasteurisés	11	22	4	9
filets pasteurisés	18	> 28	8	16

Encore une fois, on a obtenu une concentration de  $3 \cdot 10^6$  bactéries / g à  $2^\circ\text{C}$  à des temps variables (minimum 21 jours), et seulement dans les lots témoins, alors qu'aucun échantillon traité n'a dépassé cette concentration, ce qui montre bien que ces bactéries sont capables de se développer aux basses températures et par conséquent peuvent altérer un produit réfrigéré (figure III.43).

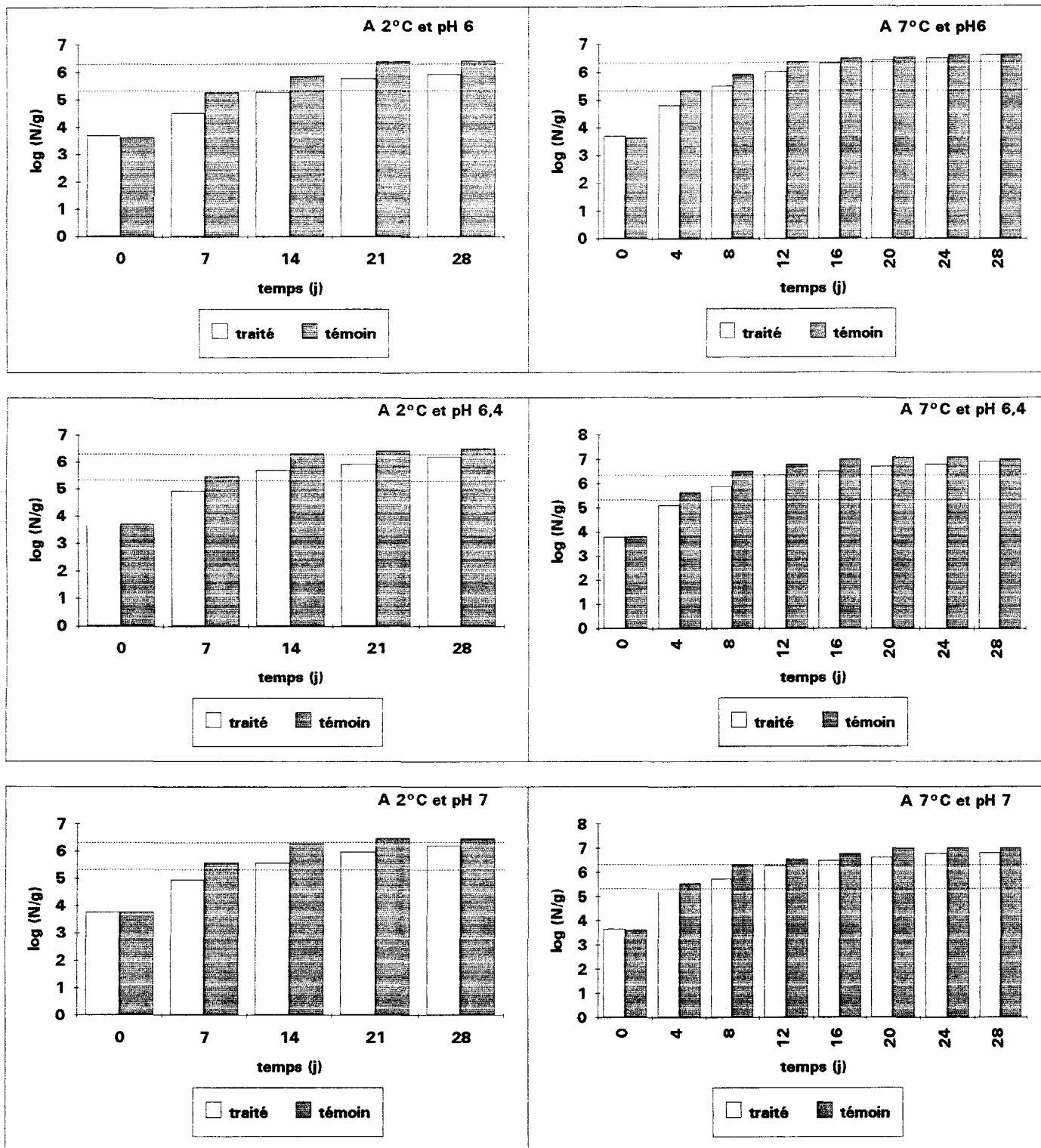


Figure n° III.44 : Evolution de la contamination par *Pseudomonas paucimobilis*, en fonction du pH et de la température, dans un échantillon de lieu noir ayant subi un traitement thermique à 60°C pendant 20 minutes, et un échantillon témoin n'ayant pas subi ce traitement.



### f.- *Pseudomonas paucimobilis*

Un traitement thermique à 60°C est appliqué aux lots traités de chair de lieu noir initialement contaminés avec une concentration de *Pseudomonas paucimobilis* d'environ  $4.10^6$  bactéries / g.

Après 20 minutes de traitement thermique, l'inoculum initial passe à environ  $9.10^3$  bactéries / g. L'ensemble des dénombrements est effectué sur milieu sélectif pour les *Pseudomonas* : milieu Cetrimide Agar. Ces évolutions sont suivies en fonction du temps, de la température de conservation et du pH de l'échantillon.

Tableau III.57 : Nombre de jours de conservation à 2°C et 7°C pour obtenir en moyenne  $3.10^5$  et  $3.10^6$  bactéries / g dans des filets de lieu noir pasteurisés et non pasteurisés ensemencés avec *Pseudomonas paucimobilis*.

<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	2°C		7°C	
	temps en jours pour obtenir $3.10^5$	temps en jours pour obtenir $3.10^6$	temps en jours pour obtenir $3.10^5$	temps en jours pour obtenir $3.10^6$
pH 6				
filets non pasteurisés	7	21	4	12
filets pasteurisés	14	> 28	7	16
pH 6,4				
filets non pasteurisés	6	15	3	7
filets pasteurisés	10	≥ 28	5	12
pH 7				
filets non pasteurisés	6	15	3	7
filets pasteurisés	11	≥ 28	5	12

*Pseudomonas paucimobilis* est une bactérie psychrotrophe capable de se développer à des températures basses (HUI, 1991). Si les tendances générales de l'évolution de la contamination sont comparables à celles des autres bactéries étudiées, on note cependant que cette bactérie est capable de se développer sur des périodes plus courtes (figure III.44). Ces résultats confirment bien les hypothèses des travaux sur la croissance de cette bactérie dans le milieu Fish (cf chapitre 2) et ils sont en rapport avec les travaux de SUTHERLAND et al., 1975, qui montrent que les *Pseudomonas* sont les premières bactéries de contamination.

### III.- COMMENTAIRES

A 2°C, après traitement, la flore étudiée évolue très lentement, mais cette multiplication est variable selon le pH de la chair du poisson et elle est significativement plus rapide à pH 6,4. Par contre, l'acidification de la chair de poisson à pH 6 ralentit nettement le développement des bactéries.

Les résultats de cette étude montrent que pour une même population initiale dans les échantillons témoins et dans les échantillons traités avant conservation, l'évolution de la contamination est nettement différente : elle est plus lente pour les filets pasteurisés que pour les filets non pasteurisés. Ce retard peut s'expliquer par le fait que la température agit sur plusieurs mécanismes de régulation de la bactérie, notamment en affectant la traduction des ARNm, le stock de ribosomes ou parfois en provoquant des lésions mineures d'acides nucléiques (RESTAINO et al., 1980; LOVETT et al., 1982), dont les conséquences les plus connues sont l'abaissement du taux de transcription des gènes, aboutissant à une teneur moindre en ARNm (MANROW et JACKSON, 1988). C'est la raison pour laquelle il faut un temps de réadaptation pour que la bactérie effectue les réparations aux différents niveaux affectés et recommence à se multiplier.

L'examen en détail des tableaux montre que, quelle que soit la bactérie, on a pratiquement la même évolution de la contamination, d'une part pour les lots témoins, d'autre part pour les lots traités : en effet, pour les lots témoins, il faut environ une semaine pour atteindre  $3.10^5$  bactéries / g, alors qu'il faut environ deux semaines pour les lots traités pour atteindre la même concentration, mais on constate que *Pseudomonas paucimobilis* est capable de se développer à des températures basses; il possède en outre le temps de latence le plus court.

A pH 6 et à 2°C, c'est pour les échantillons traités que le développement de la contamination est le plus lent. Ainsi, pour les lots témoins (non traités), il faut entre 7 et 14 jours; par contre, pour les échantillons qui ont subi un traitement thermique à 60°C, il faut au moins 14 jours pour atteindre la concentration de  $3.10^5$  bactéries / g, et on note qu'aucun échantillon traité n'a dépassé la concentration de  $3.10^6$  bactéries / g pour la durée de l'expérimentation de 4 semaines.

Etant donné que l'optimum de croissance des bactéries étudiées se situe autour du pH 7,2, on s'attendait à ce que les concentrations de  $3.10^5$  et de  $3.10^6$  bactéries / g soit atteintes plus rapidement à pH 7. Cependant l'ensemble des résultats à pH 7 est un peu surprenant puisqu'on trouve que seuls les lots de poisson dont le pH initial n'est pas modifié (pH 6,4)

atteignent les concentrations de  $3.10^5$  et  $3.10^6$  bactéries / ml dans des temps plus courts. Encore une fois, les résultats à pH 7 montrent que les bactéries des lots témoins se développent relativement plus rapidement que les mêmes bactéries traitées à  $60^\circ\text{C}$ , ce qui démontre l'effet de la chaleur sur les bactéries des échantillons traités. Pour le pH 7, il faut entre 6 et 12 jours pour atteindre la concentration de  $3.10^5$  bactéries / g à  $2^\circ\text{C}$  et il faut au moins 3 semaines pour atteindre la concentration de  $3.10^6$  bactéries / g. Pour les lots traités, il faut entre 11 et 21 jours pour atteindre  $3.10^5$  bactéries / g, par contre aucun échantillon n'a dépassé la concentration de  $3.10^6$  bactéries / g pour la période de l'expérimentation.

A  $2^\circ\text{C}$  et à pH 6,4 seules les bactéries : *Yersinia enterocolitica* 1 & 2, *Pseudomonas paucimobilis* et *Micrococcus varians* atteignent la concentration de  $3.10^6$  bactéries / g, au maximum au bout de 28 jours (durée fixée pour l'expérimentation);

A  $7^\circ\text{C}$ , l'évolution de la contamination est fonction du pH, et l'ensemble des échantillons atteint la concentration de  $3.10^6$  bactéries / ml. Il suffit de 3 à 10 jours pour que tous les micro-organismes testés atteignent la concentration de  $3.10^5$  bactéries / g, et 3 semaines au maximum pour qu'ils atteignent  $3.10^6$  bactéries / g. On note que la contamination initiale par  $10^6$  bactéries/g classe les produits dans la zone de seuil limite d'acceptabilité sur le plan réglementaire, mais il faut garder à l'esprit que les bactéries présumées pathogènes ne rentrent pas dans cette catégorie, car le seuil toléré est beaucoup plus bas et la contamination est en général moins importante (Arrêté de 1974).

Etant donné l'évolution rapide de la contamination dans les lots où le pH initial n'a pas été modifié (pH 6,4), on peut supposer que l'addition, soit de l'acide acétique, soit de la soude, est responsable de cette différence. Mais si l'utilisation de l'acide acétique est déjà limitée en agro-alimentaire, celle de la soude est encore beaucoup plus restreinte.

L'évolution de la multiplication bactérienne se fait d'une façon exponentielle dans les conditions optimales de croissance : on s'attendait à ce que la période pour passer de  $3.10^5$  bactéries / g à  $3.10^6$  bactéries / g soit plus courte que celle nécessaire pour passer de  $10^3$  bactéries / g à  $3.10^5$  bactéries / g, or on constate qu'il a fallu le même temps pour atteindre ces deux valeurs. Ceci est vraisemblablement en relation avec la faible quantité d'oxygène initialement présente à l'intérieur des échantillons et qui est progressivement consommée par les bactéries. NEWTON et RIGG, 1979, et NOTTINGHAM, 1982, rapportent dans leurs travaux que les *Pseudomonas*, bactéries aérobies strictes, sont capables de se multiplier à vitesse réduite dans des conditions de basse pression en oxygène.

Cette étude montre bien que la cuisson à basse température ( $60^\circ\text{C}$ ) ne permet qu'une période de conservation relativement courte des produits. Ceci montre l'intérêt d'utiliser une température plus importante pour la cuisson des plats cuisinés sous vide. D'autre part, d'autres

formes de contamination sont également à craindre, en particulier par des spores de *Clostridium botulinum E.* La forme végétative de *Clostridium botulinum* est capable de se développer à des températures de l'ordre de + 3°C. De plus, un tel traitement ne permet probablement pas l'inactivation des enzymes en proportion suffisante, notamment des protéases qui peuvent résister au traitement de pasteurisation si celui-ci est insuffisant, et qui dégradent alors les produits. L'utilisation d'emballages imperméables prévient aussi tout échange avec le milieu extérieur, et empêche la prolifération normale de la flore aérobie.

En conclusion, si une température de 60°C est convenable pour protéger la qualité organoleptique des produits cuisinés sous vide, il ressort de ce travail qu'une cuisson à 60°C est insuffisante pour détruire la majorité de la flore banale de contamination des plats à base de produits de la mer et qu'il est conseillé d'utiliser des températures plus élevées pour la cuisson des plats.

*chapitre 4*

**ESSAIS PRÉLIMINAIRES EN VUE DE  
L'ÉTUDE DES PROTÉINES  
BACTÉRIENNES AVANT ET APRÈS  
TRAITEMENT THERMIQUE**

## Chapitre 4

# ESSAIS PRÉLIMINAIRES EN VUE DE L'ÉTUDE DES PROTÉINES BACTÉRIENNES AVANT ET APRÈS TRAITEMENT THERMIQUE

---

L'étude est réalisée sur l'ensemble des 6 bactéries sélectionnées. Un traitement à 60°C a été réalisé dans les mêmes conditions que précédemment (Chapitre 2). Les concentrations bactériennes au départ sont voisines de  $10^9$  bactéries / ml. Après traitement, les concentrations de survivants sont entre  $10^7$  bactéries / ml et  $10^3$  bactéries / ml selon la bactérie (Tableau III.59). Si la concentration des survivants d'*Enterococcus faecium* représente une baisse de 1/10ème de la concentration initiale avant traitement, l'ensemble des autres bactéries baisse en dessous de 1 / 1000 ème de la concentration initiale, sauf *Pseudomonas paucimobilis* dont la concentration de survivants est d'environ 1 / 40 ème de la concentration initiale. C'est pour cette raison que l'on ne comparera pas les différents résultats entre eux, car le degré d'atteinte est variable selon la thermorésistance de ces bactéries à la chaleur.

L'analyse comparative des protéines bactériennes a été précédée d'une mise au point méthodologique. Elle nécessite une procédure d'extraction et de solubilisation des protéines de bactéries différentes (Gram positif et Gram négatif).

Dans un premier temps, on a développé une procédure d'extraction et de solubilisation des protéines adaptée à l'analyse par électrophorèse bidimensionnelle de protéines bactériennes; dans un deuxième temps, on a cherché à mettre en évidence l'existence de modifications physiologiques dans des conditions hostiles de température par la comparaison des profils électrophorétiques des protéines avant et après le traitement thermique.

### **I.- OPTIMISATION DE LA TECHNIQUE DE L'EXTRACTION DES PROTEINES**

En théorie, l'électrophorèse monodimensionnelle, en conditions dénaturantes, permet la résolution à partir d'un échantillon d'une centaine de polypeptides. Ceci est généralement insuffisant pour l'analyse des mélanges protéiques complexes présents dans la plupart des fractions cellulaires ou tissulaires. En 1975, O'FARRELL optimisa la séparation des protéines en fonction de 2 paramètres indépendants : la charge électrique, et la masse moléculaire



relative des polypeptides. Il caractérisa ainsi plus de 1000 polypeptides à partir de cultures cellulaires d'*Escherichia coli*.

L'analyse des protéines bactériennes solubles par électrophorèse bidimensionnelle nécessite que la lyse des bactéries soit maximale et que les protéines ne soient pas affectées en cours d'extraction. Il faut en particulier que l'activité des oxydases soit inhibée pendant l'extraction.

Pour obtenir des électrophorèses bidimensionnelles de protéines reproductibles et de bonne qualité, permettant la mise en évidence d'un grand nombre de polypeptides, deux méthodes d'extraction ont été essayées :

- La première méthode utilise une lyse enzymatique avec le lysozyme pour éliminer la paroi des bactéries. L'expérimentation est effectuée sur deux types de bactéries (des Gram positif et des Gram négatif); il s'est avéré que la lyse des bactéries Gram positif par les enzymes est très difficile, voire impossible dans le cas de *Micrococcus varians*. Par ce protocole, 33 à 105 polypeptides seulement sont répertoriés dans le cas d'*Enterococcus faecium* (Planche 1AB). Ces polypeptides se situent dans une gamme de poids moléculaires allant de 7 à 120 kDa avec des pHi de 3 à 10.

- Dans la deuxième méthode, les bactéries sont soumises à la presse de French. Dans ces conditions, pour *Enterococcus faecium*, 423 à 491 polypeptides sont observés (Planche 1CD), dans la même gamme de poids moléculaires et dans la même zone de pH que celles observées précédemment avec la première méthode. De plus, grâce à cette technique, l'utilisation de piperazine di-acrylamide (PDA) à la place du bisacrylamide a permis l'amélioration de la séparation des protéines (BOYER, 1992). C'est donc cette dernière technique qui a été retenue dans la suite des travaux.

## **II.- ANALYSE ELECTROPHORETIQUES DES PROTEINES AVANT ET APRES TRAITEMENT THERMIQUE**

L'électrophorèse bidimensionnelle a été appliquée aux extraits protéiques totaux des bactéries obtenus avant et après traitement thermique. L'étude des profils protéiques se fait, pour une même souche, par comparaison entre un échantillon témoin n'ayant pas subi de traitement thermique et l'échantillon traité. Les deux états étudiés présentent des polypeptides répartis dans une gamme de pH de 3,5 à 9 et des masses moléculaires allant de 8 à 120 kDa.

Etant donné le nombre important de différences sur les profils protéiques, et pour ne pas charger les figures de toutes les modifications constatées, seules les zones qui présentent le plus de changements sont décrites.

**Tableau n° III.58 : Analyse électrophorétique des profils des protéines avant et après traitement thermique des différentes bactéries.**

	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica 1</i>	<i>Yersinia enterocolitica 2</i>	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>
durée du traitement température du traitement	20 min (60°C)	10 min (60°C)	14 min (60°C)	14 min (60°C)	17 min (60°C)	20 min (60°C)
nombre total de polypeptides avant	491	458	494	490	353	400
nombre total de polypeptides après	423	475	433	403	321	411
nombre de bandes non présentes	87 (17,7%)	86 (18,8 %)	124 (25 %)	36 (7,5 %)	70 (19,8%)	79 (20 %)
nouvelles apparitions après traitement	69	60	63	49	38	90
augmentation de concentration	21 (4,3 %)	14 (3,1 %)	20 (4,1 %)	62 (12,7%)	7 (2 %)	78 (19,5%)
diminution de concentration	30 (6,1 %)	21 (4,6 %)	37 (7,5 %)	1	26 (7,4 %)	8 (2 %)

Dans le tableau résumé n° III.58 , on a noté les différents changements survenus. Les effets du traitement thermique sur les protéines sont de trois types :

- augmentation ou diminution de la concentration de certains polypeptides;
- disparition de certains polypeptides;
- apparition de nouveaux polypeptides.

L'évolution des protéines est fonction de chaque bactérie. Le nombre de protéines est plus important après traitement pour *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas paucimobilis*; pour les quatre autres souches, le nombre de protéines est plus faible après traitement thermique. Si le nombre de protéines des 2 échantillons témoins de *Yersinia enterocolitica* est voisin, l'évolution après traitement est différente (tableau n° III.58) et l'on note un seul polypeptide dont la concentration diminue pour *Yersinia enterocolitica* 2, alors que 37 polypeptides voient leur concentration diminuer chez *Yersinia enterocolitica* 1.

Afin de montrer les effets des traitement thermiques sur les profils polypeptidiques, 3 zones ont été analysées en détail. Le choix de cette méthode est inspiré par l'étude bibliographique : en effet, un grand nombre d'auteurs y ont recours (BOYER, 1992), c'est à dire qu'après une analyse détaillée des profils protéiques, ils s'attardent sur les zones qui présentent le plus d'intérêt pour leur étude. Dans le cas présent, c'est par simplification que l'on a choisi ces 3 zones, où l'on a noté un nombre important de différences entre l'échantillon témoin et l'échantillon traité. Ces zones ne sont pas exactement les mêmes dans chaque électrophorogramme, elles varient en fonction des poids moléculaires et du pH isoélectrique.

Par ailleurs, on a utilisé des flèches différentes pour distinguer les polypeptides :

- les flèches "A" correspondent aux polypeptides qui sont détectés de manière spécifique à la fin du traitement;
- les flèches "B" correspondent aux polypeptides qui ont disparu;
- les flèches "C" correspondent à ceux dont la concentration a augmenté;
- les flèches "D" correspondent à ceux dont la concentration a diminué.

Le chiffre en indice représente le poids moléculaire (en kDa) du polypeptide.

Pour les zones agrandies qui se recouvrent, on n'a compté qu'une fois les mêmes polypeptides.

IEF ←  
↓  
S  
D  
S

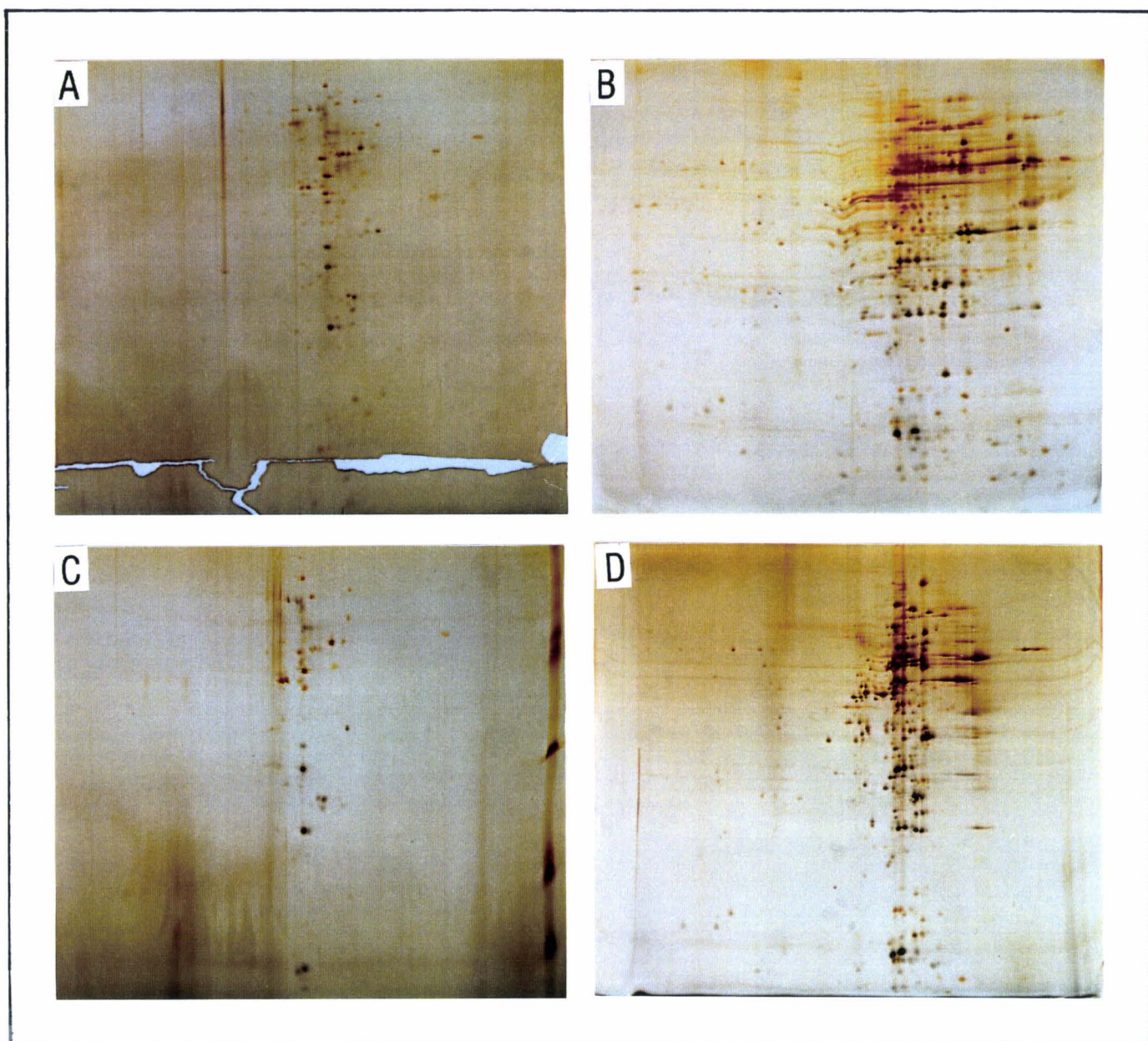


Planche 1

Electrophorèses bidimensionnelles de protéines totales d'*Enterococcus faecium*, dans un gel contenant 15 % d'acrylamide / PDA, ampholines 3,5-9 LKB et ampholines 5-7 BioRad.

(A) & (B) : bactéries témoins, la lyse bactérienne est effectuée par l'action du lysozyme.

(C) & (D) : bactéries qui ont subi un traitement thermique, la lyse bactérienne est effectuée par la presse de French.



## 1. *Enterococcus faecium*

Après 20 minutes de traitement thermique à 60°C, le nombre de polypeptides passe de 491 chez le témoin à 423 (Planche 2AB). 87 polypeptides (17,7 %) disparaissent, 21 (4,3 %) ont leur concentration qui augmente, alors que 30 (6,1 %) voient leur concentration diminuer par rapport au témoin (Planche 2 AB) et que 69 nouveaux polypeptides (14 %) sont détectés.

**Zone 1** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 25 à 58 kDa et une gamme de pH allant de 3 à 4,5.

Sur la carte protéique (Planche 3 AB), 13 polypeptides ne sont pas détectés : B31,6; B32a; B32b; B32,5; B32,6; B35,5; B39; B41; B44; B47; B48,5; B58a; B58b. Outre la disparition de ces polypeptides après traitement, il y a détection de 7 nouveaux polypeptides : A30; A36,7; A39; A40; A51; A52; A59,2. Enfin, 2 polypeptides détectés voient leur concentration augmenter (C51; C59).

**Zone 2** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 20 à 65 kDa et dans une gamme de pH allant de 6 à 8 .

Elle est marquée par de profonds remaniements: en effet, 20 polypeptides ne sont plus détectés après traitement (Planche 3 A2B2), 2 polypeptides voient leur concentration diminuer (D27a; D27b) et 4 nouveaux polypeptides sont détectés : A38,5; A39; A42; A47.

**Zone 3** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 10 à 20 kDa et dans une gamme de pH allant de 5 à 8 unités.

Cette zone est marquée par un certain nombre de disparitions et d'apparitions de nouveaux polypeptides. 13 polypeptides ne sont plus détectés dans cette zone (Planche 3 A3B3), 2 polypeptides (C9; C9,2) voient leurs concentrations augmenter alors que 7 nouveaux polypeptides apparaissent (A10; A11; A12; A13; A13,5; A16,5; A17).

## 2. *Staphylococcus aureus*

Le choc thermique a été effectué à 60°C pendant 10 minutes (Planche 2CD), le nombre total des polypeptides au départ est de 458, ce nombre augmente pour atteindre 475 polypeptides. 86 polypeptides (18,8 %) disparaissent, 14 (3,1 %) ont leur concentration qui augmente alors que 21 (4,6 %) voient leur concentration diminuer par rapport au témoin (Planche 2CD). 60 nouveaux polypeptides apparaissent.

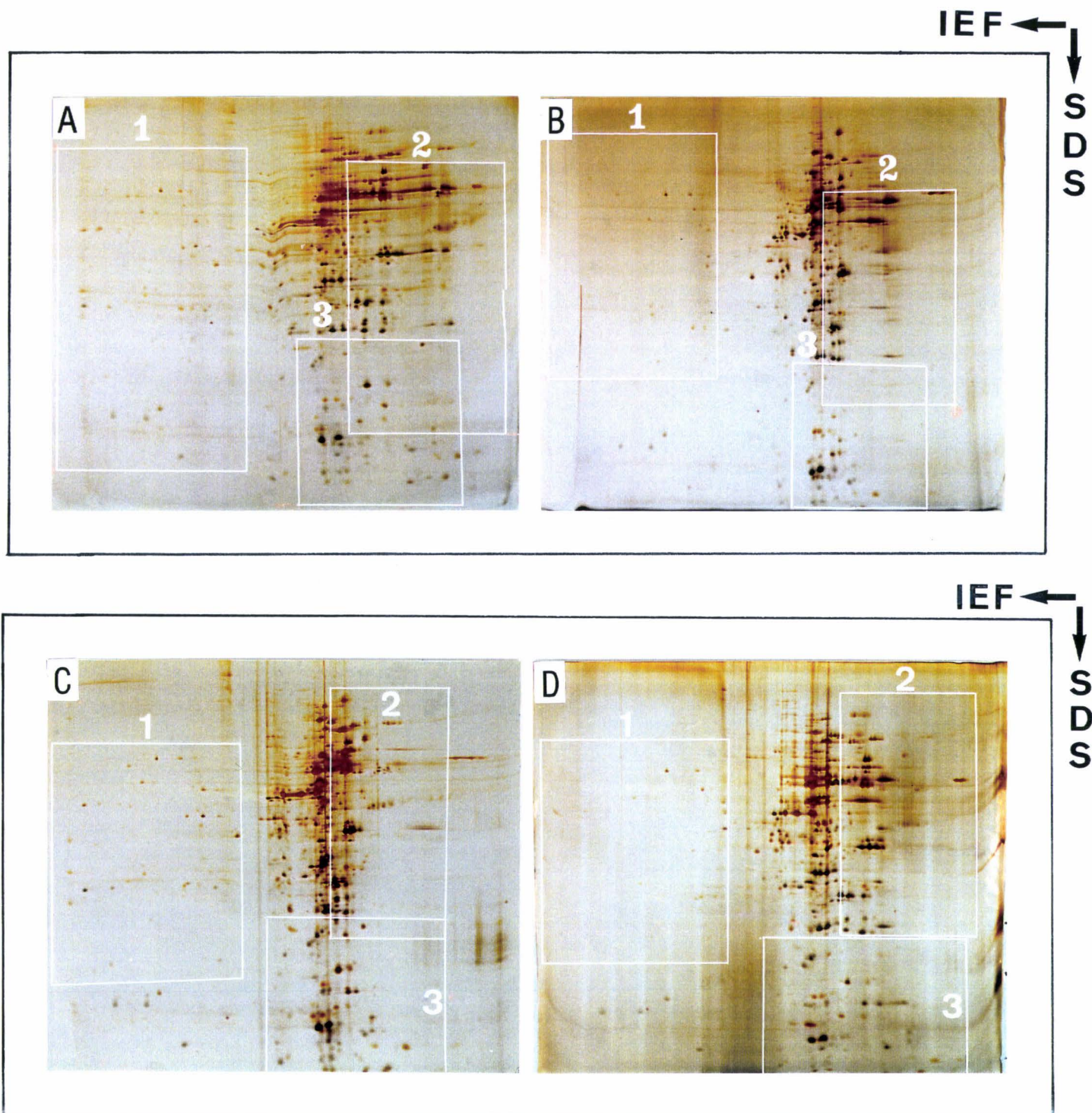


Planche 2

Electrophorégrammes bidimensionnels des protéines totales d'*Enterococcus faecium* et de *Staphylococcus aureus* dont la lyse bactérienne a été effectuée par la presse de French.

*Enterococcus faecium*

(A) échantillon témoin qui n'a pas subi de traitement thermique; (B) échantillon qui a subi un traitement thermique pendant 20 minutes à 60°C.

*Staphylococcus aureus*

(C) échantillon témoin qui n'a pas subi de traitement thermique; (D) échantillon qui a subi un traitement thermique pendant 10 minutes à 60°C.

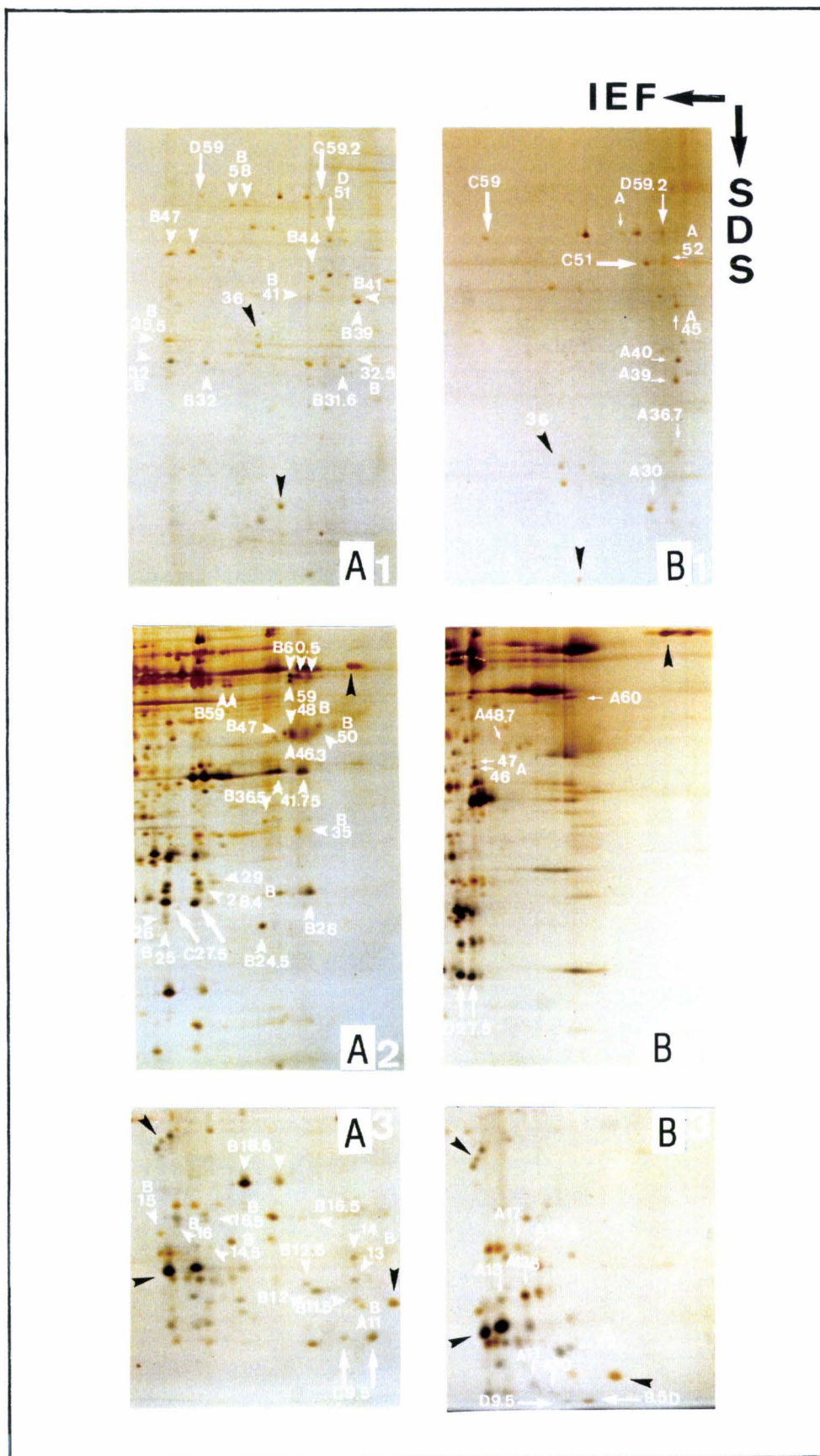


Planche 3

Régions des électrophorogrammes bidimensionnels des protéines totales d'*Enterococcus faecium* avec ou sans traitement. (A) bactéries témoins; (B) bactéries après traitement à 60°C pendant 20 minutes. Les flèches A, B, C et D correspondent respectivement aux polypeptides qui ont apparu, qui ont disparu, dont la concentration a augmenté, dont la concentration a diminué.





**Zone 1** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires de 24 à 90 kDa et dans une gamme de pH allant de 3 à 4,5 .

L'analyse des profils protéiques montre les différences suivantes : 26 polypeptides ne sont plus détectés après un traitement thermique à 55°C pendant 22 minutes (Planche 4 C1D1). 4 nouveaux polypeptides sont détectés (A52a; A52b; A53c; A67), mais cette zone montre la présence de 5 polypeptides qui sont en concentration plus faible : D37,5; D38; D57; D60; D73. A ce niveau, aucun polypeptide détecté n'a augmenté de concentration.

**Zone 2** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 32 à 120 kDa et une gamme de pH allant de 6 à 8 .

Au niveau de cette zone, plusieurs polypeptides disparaissent aussi après le traitement thermique : 16 polypeptides disparaissent (Planche 4 C2D2). 12 nouveaux polypeptides apparaissent : A39; A40; A46a; A46b; A60; A93; A102a; A102b; A102c; A106a; A106b; A120. 4 polypeptides détectés ont une concentration plus faible (D58; D58,5; D83; D84) alors que 4 polypeptides voient leur concentration augmenter (C32,2; C47; C107; C120).

**Zone 3** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 15 à 32 kDa et dans une gamme de pH allant de 5 à 8 unités.

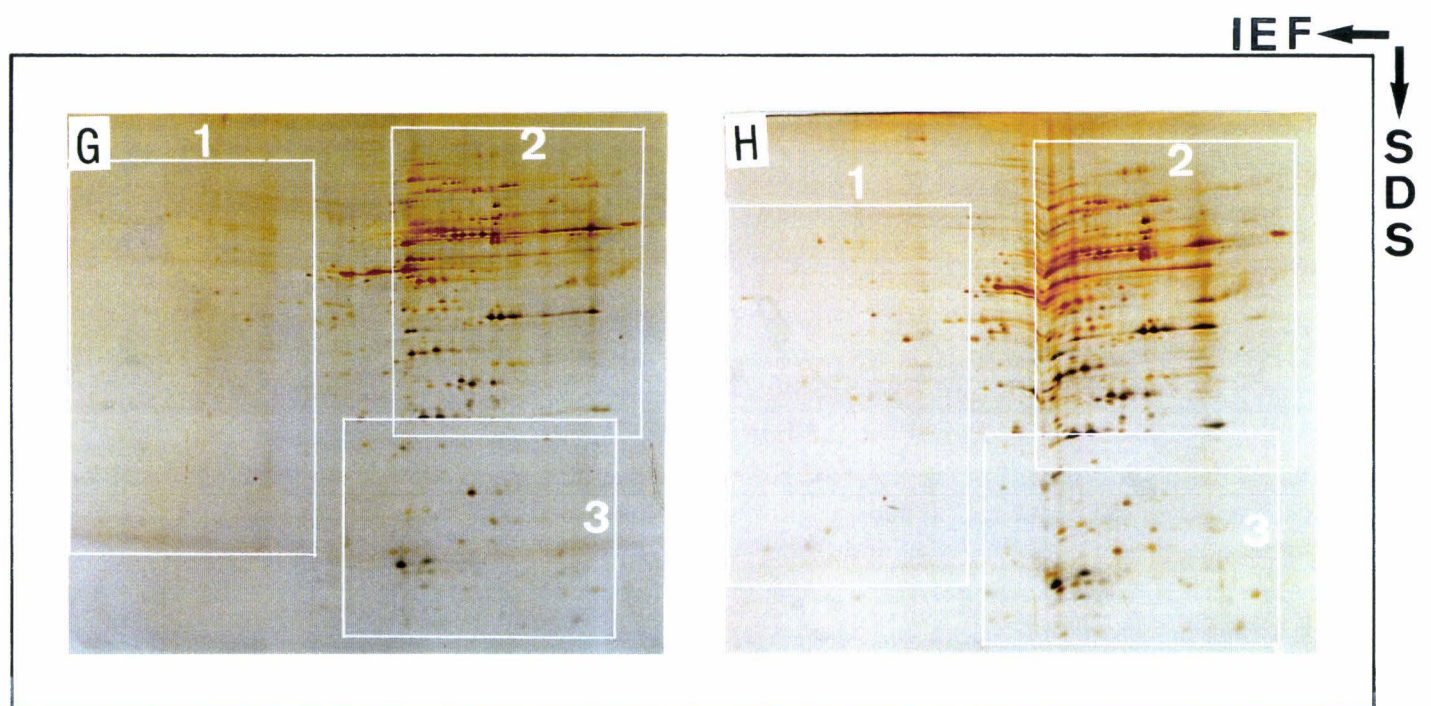
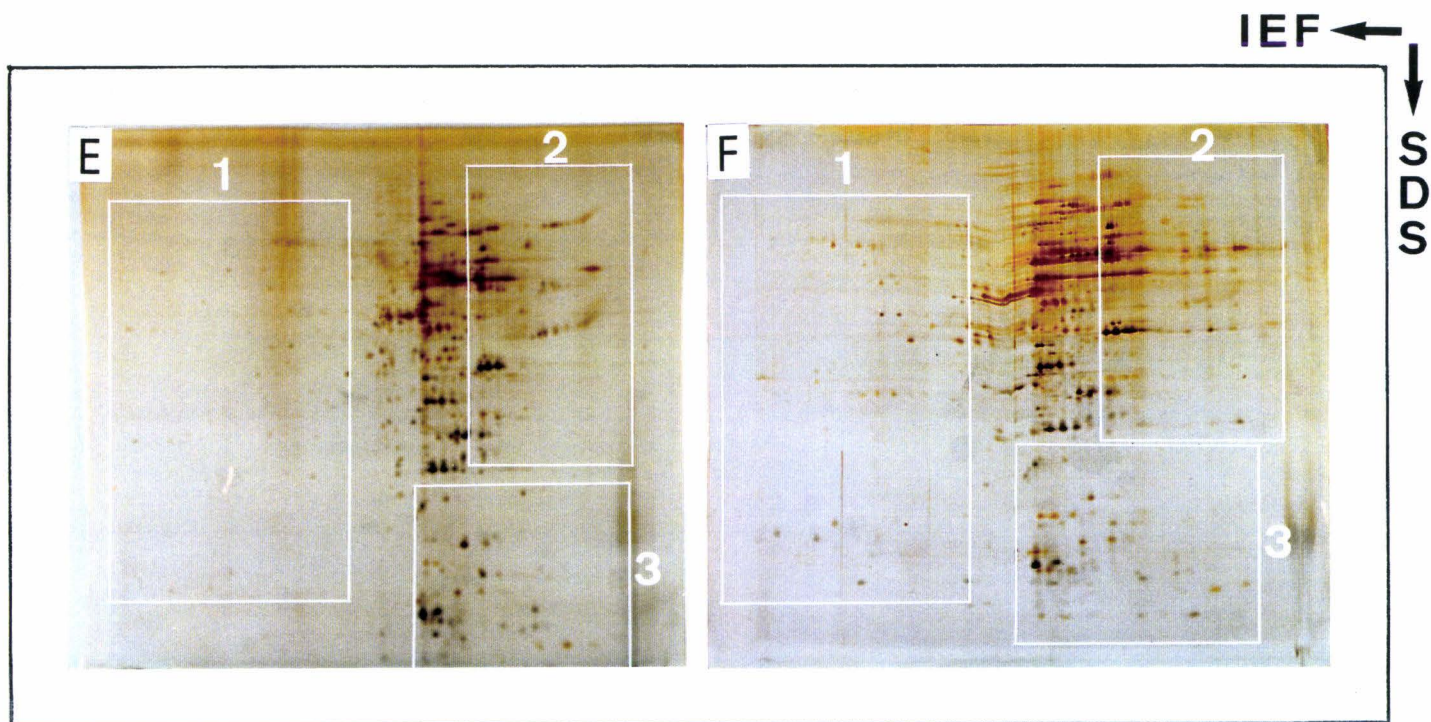
Elle est aussi marquée par un nombre élevé de disparitions après le traitement effectué : en effet, 15 polypeptides ne sont plus détectés (Planche 4 C3). A l'inverse, 7 polypeptides apparaissent (A17,5; A18; A20; A20,9; A21; A27; A30), mais 13 polypeptides détectés voient leur concentration diminuer (Planche 6 D3).

### **3. *Yersinia enterocolitica* 1**

Le traitement thermique a été effectué à 60°C pendant 14 minutes. Le nombre total de polypeptides passe de 494 chez le témoin à 433 chez la bactérie après traitement (Planche 5EF). Après traitement, 124 polypeptides (25 %) disparaissent par rapport au témoin (Planche 5E), 37 polypeptides (7,5 %) voient leur concentration diminuer et 20 polypeptides (4,1 %) voient leur concentration augmenter. Toujours par rapport au témoin, 63 nouveaux polypeptides apparaissent (Planche 5EF).

**Zone 1** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires de 17 à 100 kDa et une gamme de pH allant de 3 à 4,5 .

Les Planches 6 E1 et 6 F1 montrent respectivement les profils des protéines totales de la bactérie à la fin de la croissance et après un traitement thermique. 11 polypeptides



### Planche 5

Electrophorogrammes bidimensionnels des protéines totales de *Yersinia enterocolitica* 1 et de *Yersinia enterocolitica* 2 dont la lyse bactérienne est effectuée par la presse de French.

*Yersinia enterocolitica* 1

(E) échantillon témoin qui n'a pas subi de traitement thermique; (F) échantillon qui a subi un traitement thermique pendant 14 minutes à 60°C.

*Yersinia enterocolitica* 2

(G) échantillon témoin qui n'a pas subi de traitement thermique; (H) échantillon qui a subi un traitement thermique pendant 14 minutes à 60°C.



disparaissent après traitement (B30; B33a; B33b; B34; B53; B63,5a; B63,5b; B90; B99a; B99b; B100). 2 polypeptides voient leur concentration diminuer (D63; D66,7), alors que 4 nouveaux polypeptides sont détectés (A17,5; A34; A38; A52,75). Enfin, 10 polypeptides voient leur concentration augmenter (Planche 6 E1F1).

**Zone 2** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 30 à 110 kDa et une gamme de pH allant de 6 à 8.

Cette zone est marquée par de nombreuses modifications : en effet 36 polypeptides disparaissent (Planche 6 E2), alors que 14 nouveaux polypeptides sont détectés (Planche 6 F2). 5 polypeptides voient leur concentration diminuer (D36; D36,2; D40; D73; D92), alors qu'un polypeptide voit sa concentration augmenter (C40).

**Zone 3** : Elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 12 à 25 kDa et dans une gamme de pH allant de 5 à 8.

Cette zone est marquée par un certain nombre de disparitions (B12,7; B15,3; B17,3; B20,5a; B20,5b; B22). Par contre quatre apparitions sont détectées (A12,2; A13; A14; A16). 9 polypeptides sont détectés en concentration plus faible (Planche 6 E3F3), alors qu'un polypeptide voit sa concentration augmenter (C18).

#### **4. *Yersinia enterocolitica* 2**

Le traitement thermique a été réalisé comme précédemment. Le nombre de polypeptides total passe de 490 au départ à 403 après un traitement thermique de 14 minutes à 60°C : 36 polypeptides (7,5 %) disparaissent, 62 polypeptides (12,7 %) ont leur concentration qui augmente alors qu'un seul polypeptide voit sa concentration diminuer. 49 polypeptides apparaissent (Planche 5 GH).

**Zone 1** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 22 à 96 kDa et dans une gamme de pH allant de 3 à 4,5 .

Après le traitement thermique, 4 polypeptides disparaissent (B56; B90a; B90b; B95), 4 nouveaux polypeptides apparaissent (A32; A35; A52; A57), mais au niveau de cette zone, 14 polypeptides détectés voient leur concentration augmenter (Planche 7 G1H1), par contre, aucun polypeptide dont la concentration aurait diminué n'est détecté.

**Zone 2** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 10 à 110 kDa et dans une gamme de pH allant de 6,5 à 8 .

Au niveau de cette zone, 13 polypeptides disparaissent (Planche 7 G2), alors que 10 nouveaux polypeptides sont détectés (Planche 7 H2). 4 polypeptides détectés voient leur

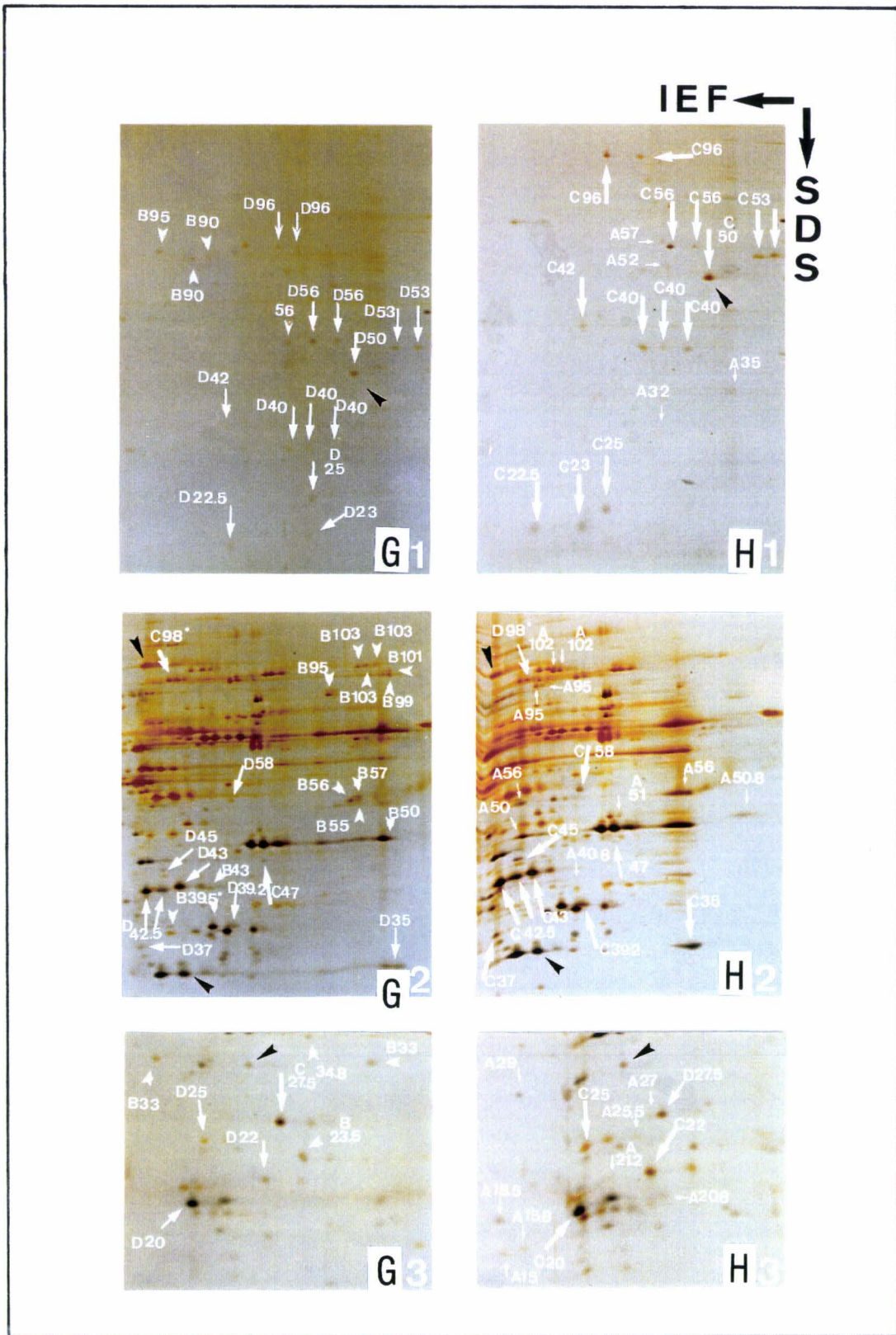


Planche 7

Régions des électrophorogrammes bidimensionnels des protéines totales de *Yersinia enterocolitica* 2 avec ou sans traitement. (G) bactéries témoins; (H) bactéries après traitement à 60°C pendant 14 minutes. Les flèches A, B, C et D correspondent respectivement aux polypeptides qui ont apparu, qui ont disparu, dont la concentration a augmenté, dont la concentration a diminué.

concentration diminuer (D47; D98a; D98b; D98c), mais 8 polypeptides voient leur concentration augmenter.

**Zone 3** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 15 à 35 kDa et dans une gamme de pH allant de 5 à 8 .

Cette zone accuse 4 disparitions (B23,5; B33a; B33b; 34,8), 8 nouveaux polypeptides sont détectés (A15; A15,8; A18,8; A20,8; A21,2; A25,5; A27; A29). Quelques modifications sont liées à l'augmentation de la concentration : en effet 3 polypeptides voient leur concentration augmenter (C20; C22, C25), mais 1 seul (D27,5) voit sa concentration diminuer (Planche 7 G3H3).

On constate que les 2 bactéries *Yersinia enterocolitica* ne réagissent pas de la même façon à la chaleur : cela peut être lié à des différences au niveau génétique des bactéries.

### 5. *Micrococcus varians*

Pour *Micrococcus varians*, le traitement thermique était de 17 minutes à 60°C, le nombre total de polypeptides passe de 353 chez le témoin à 321 chez le lot traité. Après traitement, 70 polypeptides (19,8 %) disparaissent par rapport au témoin (Planche 8 I), 26 polypeptides (7,4 %) voient leur concentration diminuer et seulement 7 polypeptides (2 %) voient leur concentration augmenter, 38 nouveaux polypeptides étant observés (Planche 8 IJ).

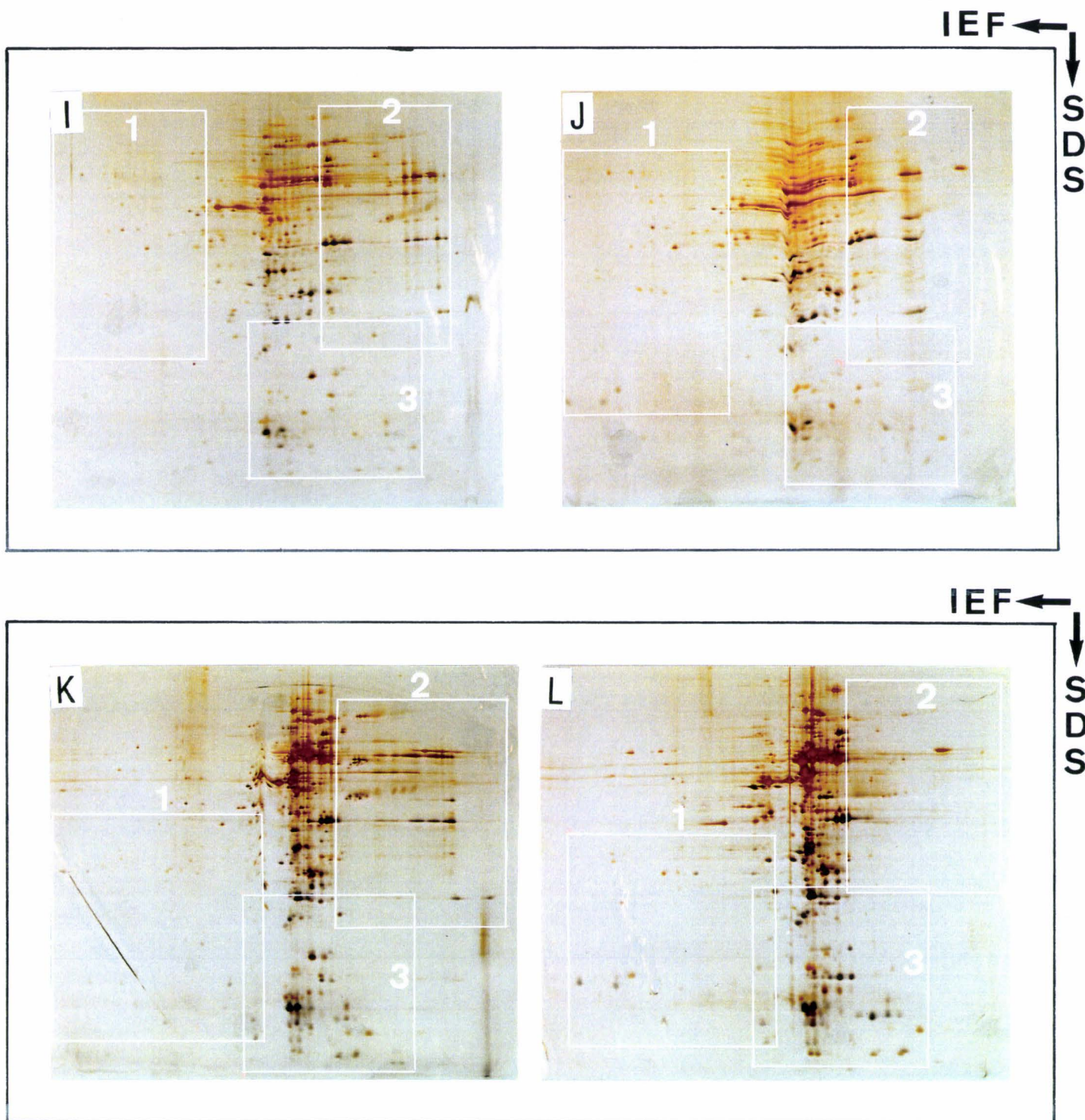
**Zone 1** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires de 18 à 67 kDa et une gamme de pH allant de 3 à 4,5 .

Au niveau de cette zone, 2 polypeptides (B49; B52) disparaissent. Par contre, 18 nouveaux polypeptides sont détectés (Planche 9 I1J1). Un seul polypeptide voit sa concentration diminuer (D44) mais 5 polypeptides voient leur concentration augmenter (C34; C36,5; C40; C44,5; C67)

**Zone 2** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 27 à 98 kDa et dans une gamme de pH allant de 6 à 8 .

Dans cette zone, 22 polypeptides disparaissent (Planche 9 I2J2), mais il y a 5 apparitions (A35,5; A43,6; A60a; A60b; A60c). Il y a 3 polypeptides dont la concentration diminue (D83; D97,5a; D97,5b), alors que 2 polypeptides voient leur concentration augmenter (C44a; C44b).

**Zone 3** : elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 14 à 27 kDa et dans une gamme de pH allant de 5 à 8 .



### Planche 8

Electrophorogrammes bidimensionnels des protéines totales de *Micrococcus varians* et de *Pseudomonas paucimobilis* dont la lyse bactérienne est effectuée par la presse de French.

*Micrococcus varians*

(I) échantillon témoin qui n'a pas subi de traitement thermique; (J) échantillon qui a subi un traitement thermique pendant 17 minutes à 60°C.

*Pseudomonas paucimobilis*

(K) échantillon témoin qui n'a pas subi de traitement thermique; (L) échantillon qui a subi un traitement thermique pendant 20 minutes à 60°C.

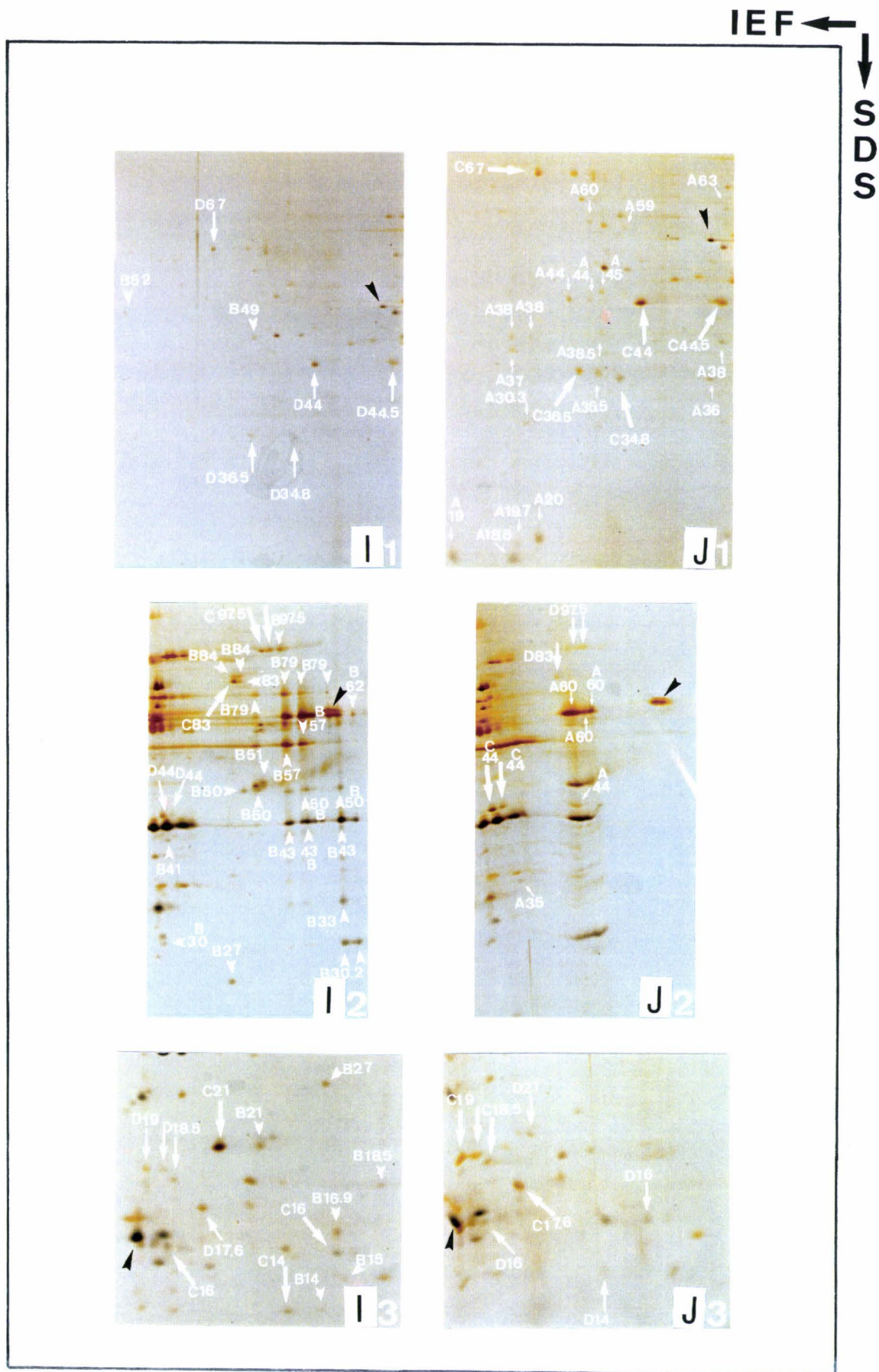


Planche 9

Régions des électrophorogrammes bidimensionnels des protéines totales de *Micrococcus varians* avec ou sans traitement. (I) bactéries témoins; (J) bactéries après traitement à 60°C pendant 17 minutes. Les flèches A, B, C et D correspondent respectivement aux polypeptides qui ont apparu, qui ont disparu, dont la concentration a augmenté, dont la concentration a diminué.



Dans cette zone, aucun polypeptide nouveau n'est détecté après le traitement thermique (Planche 9 J3); 4 polypeptides ne sont plus détectés (B14; B16a; B16b; B21). 4 polypeptides voient leur concentration diminuer (D13,75; D16; D17; D20), alors que 4 polypeptides voient leur concentration augmenter (C17,6; C18,5; C19a; C19b).

## **6. *Pseudomonas paucimobilis***

Pour *Pseudomonas paucimobilis*, le nombre total de polypeptides est de 400 au départ, ce nombre passe à 411 après un traitement thermique à 60°C pendant 20 minutes. Après traitement, 79 polypeptides (20 %) disparaissent, 78 (19,5), ont leur concentration augmentée alors que 8 (2 %) voient leur concentration diminuer par rapport au témoin (Planche 8 KL) et que 90 nouveaux polypeptides sont détectés.

**Zone 1 :** elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 12 à 35 kDa et dans une gamme de pH allant de 3 à 4,5 .

Dans cette zone, 7 polypeptides ne sont pas détectés après traitement (B22,5; B23; B32a; B32b; B32,5; B33; B34). 4 nouveaux polypeptides apparaissent (A16; A17; A27; A29,5), 12 polypeptides détectés voient leur concentration augmenter (Planche 10 K1L1), alors qu'un seul polypeptide voit sa concentration diminuer (D17,6).

**Zone 2 :** elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 26 à 103 kDa et dans une gamme de pH allant de 6,5 à 8 .

Au niveau de cette zone, 26 polypeptides disparaissent (Planche 10 L2), mais seulement 4 nouveaux polypeptides apparaissent (A53; A65,5; A72; A92). 8 polypeptides voient leur concentration diminuer (Planche 10 L2), mais un seul polypeptide voit sa concentration augmenter (C24).

**Zone 3 :** elle se situe dans une gamme de masses moléculaires allant de 7 à 29 kDa et dans une gamme de pH allant de 5 à 8 .

Cette zone est marquée par 21 apparitions (Planche 10 L3), seules 3 disparitions sont détectées (B18; B26,5; B28,8). La concentration de 9 polypeptides augmente (C7; C7,4; C12,75; C13; C16a; C16b; C17,75a; C17,75b; C18), tandis que celle de 3 polypeptides diminue (D9; D21a; D21b).

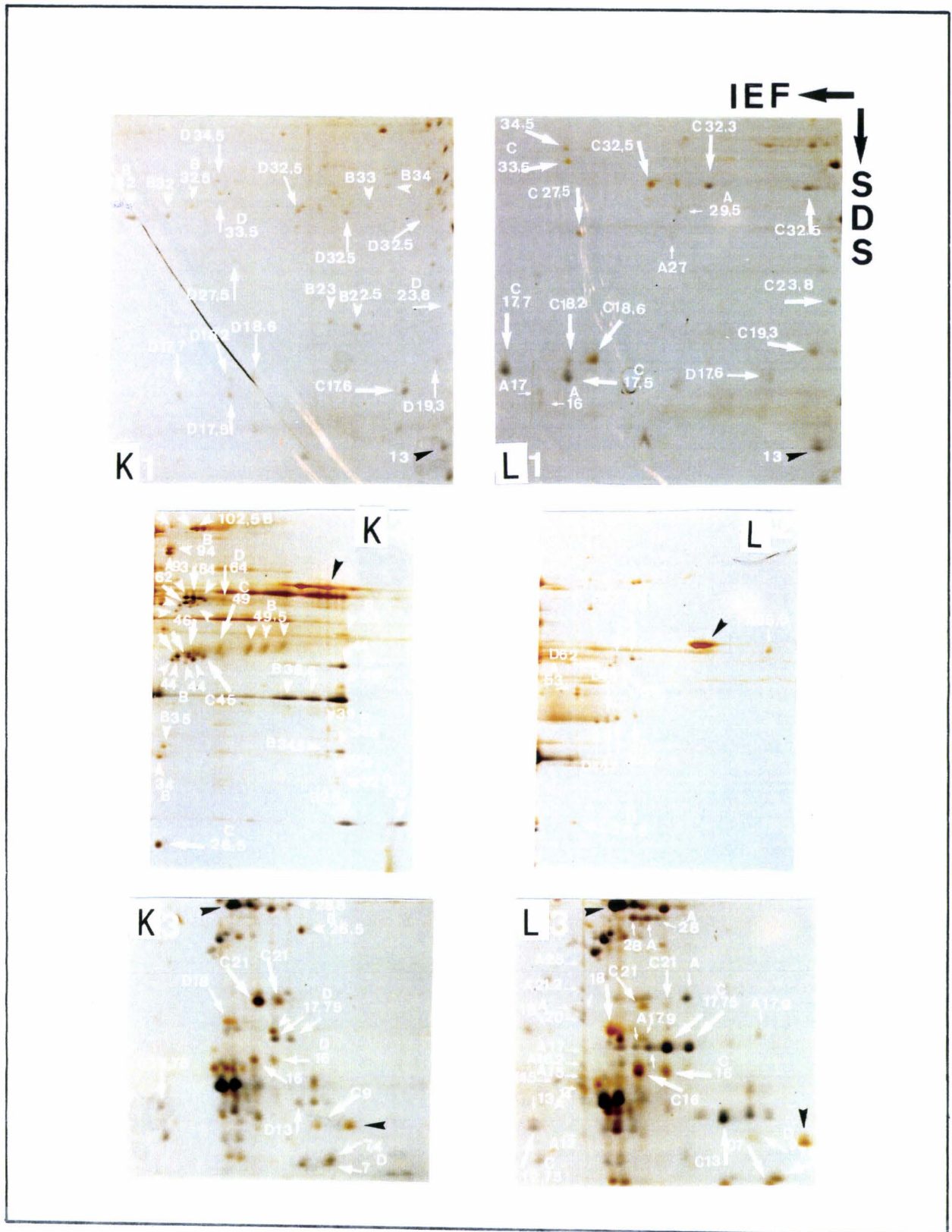


Planche 10

Régions des électrophorogrammes bidimensionnels des protéines totales de *Pseudomonas paucimobilis* avec ou sans traitement. (K) bactéries témoins; (L) bactéries après traitement à 60°C pendant 20 minutes. Les flèches A, B, C et D correspondent respectivement aux polypeptides qui ont apparu, qui ont disparu, dont la concentration a augmenté, dont la concentration a diminué.

### III.- COMMENTAIRES

Les protocoles d'extraction testés introduisent des variations considérables dans le nombre des polypeptides observés. L'extraction des protéines dans du tampon Tris + lysozyme n'est que partielle et ne permet pas une étude complète des polypeptides totaux des bactéries : en effet, les profils polypeptidiques renferment moins d'informations que ceux obtenus par extraction à la presse de French. L'amélioration s'explique vraisemblablement par la lyse totale des bactéries et la libération du contenu cytoplasmique dans le milieu, sous la pression mécanique. Ce protocole étant mis au point, il permet de mieux apprécier la proportion des protéines bactériennes modifiées.

L'effet direct de la température sur l'état physiologique des micro-organismes a été recherché par observation des profils protéiques : après culture à 37°C pendant 16 heures, une moitié de la culture, constituant le lot témoin, est conservée à 4°C, l'autre moitié est traitée à 60°C; la température de 60°C est choisie arbitrairement. Cependant, pour tenir compte des résultats de l'étude de l'effet thermique sur les bactéries les plus thermorésistantes, la durée du traitement a été allongée. Dans les échantillons soumis à l'effet de la température, plusieurs différences ont été observées avec les échantillons non traités : la concentration de plusieurs polypeptides diminue ou augmente, certains polypeptides ne sont plus détectés, et d'autres au contraire apparaissent. La quantité totale des protéines présentes dans le milieu Fish après centrifugation de chaque culture est du même ordre de grandeur; cependant sa composition n'a pas été analysée. On s'est limité par la suite aux protéines cellulaires de l'ensemble des bactéries survivantes et tuées.

De nombreux travaux ont mis en évidence que la température est le principal facteur affectant tous les micro-organismes (HERBERT et al., 1979). Dans cette étude, on a relevé qu'à 60°C, la température a réduit la population bactérienne de 1 / 10ème de sa valeur dans le cas d'*Enterococcus faecium* après incubation, et les autres bactéries survivantes ont baissé de 1/1000ème de la concentration initiale, sauf *Pseudomonas paucimobilis*, où le taux des survivants n'est que de 1 / 40ème de la population initiale. C'est cette température qui peut être létale pour les bactéries, et qui peut facilement dénaturer plusieurs protéines et libérer des produits de dégradation dans la cellule.

	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> 1	<i>Yersinia enterocolitica</i> 2	<i>Micrococcus varians</i>	<i>Pseudomonas paucimobilis</i>
$N_0$ (bact./ ml)	1,1.10 <sup>8</sup>	3,2.10 <sup>9</sup>	4.10 <sup>9</sup>	6.10 <sup>9</sup>	4.10 <sup>8</sup>	8,9.10 <sup>8</sup>
$N$ (bact./ ml)	1.10 <sup>7</sup>	7,3.10 <sup>3</sup>	0,8.10 <sup>3</sup>	1,2.10 <sup>3</sup>	2,3.10 <sup>4</sup>	2,3.10 <sup>7</sup>
temps d'incubation (min)	20	10	14	14	17	20
$D_{60}$ (min)	6,5	1,3	1,6	1,6	2,7	5,5

**Tableau III.59 :** Tableau résumé des conditions expérimentales des traitements thermiques des bactéries à 60°C

D'autres facteurs peuvent provoquer la perturbation de l'environnement des micro-organismes comme les ultraviolets, l'irradiation (NYSTRÖM et al., 1992), l'acide nalidixique (KRAMER et al., 1988), l'éthanol (MÅRÉN et al., 1987).

L'apparition d'un grand nombre de polypeptides serait à attribuer aux différents stress subis par les bactéries. Les polypeptides de poids moléculaire faible peuvent provenir, soit d'une synthèse non achevée de polypeptides (on pourrait supposer une synthèse nouvelle, mais cette hypothèse est moins probable en raison de la température d'incubation très élevée), soit des produits de dégradation des protéines en petites molécules et de leurs nouvelles migrations selon la charge et le poids moléculaire des sous-unités protéiques. Dans les travaux de BHARVIN et al., 1990, chez *Mycobacterium bovis* BCG, cultivé à 37°C et incubé par la suite à des températures de 42°C, 45°C et 48°C, des prélèvements ont été effectués toutes les 15 minutes pendant 90 minutes. Ils ont constaté qu'il faut seulement 15 minutes pour l'apparition des premières synthèses protéiques qui donnent des constituants de poids moléculaires faibles; les auteurs ont également constaté qu'à 48°C, après 45 minutes, peu de synthèses sont effectuées.

La diminution ou l'augmentation de la quantité d'un polypeptide pourrait résulter d'un ou de plusieurs mécanismes de régulation cellulaire. La baisse de la teneur d'un polypeptide peut être due à sa dégradation; celle-ci peut aussi être accélérée sous l'effet d'une activation des protéases dans des conditions hostiles. La diminution peut aussi correspondre à plusieurs mécanismes, soit affectant la traduction des ARNm ou le stock de ribosomes, soit provoquant des lésions mineures d'acides nucléiques (RESTAINO et al 1980, LOVETT et al 1982). Les causes les plus connues sont l'abaissement du taux de transcription des gènes, aboutissant à une teneur moindre en ARNm, (MANROW et JACOBSON, 1988), et la déstabilisation des pools

d'ARNm induisant une dégradation rapide des ARNm traduisibles. Toutefois, tout processus affectant la maturation des ARNm (DREYFUSS et al., 1988) ou leur traduction retentira sur la taille des d'ARNm traduisibles et, par conséquent, sur la taille des polypeptides.

Il a été démontré que l'ensemble des organismes - de la bactérie à l'homme - répondent à un stress par la synthèse de quelques protéines : les protéines de stress ou "heat-shock proteins", (HSP) (NOVER et al., 1984; CRAIG, 1985; LINQUIST, 1986; BOND et al., 1987).

Pour mieux apprécier, avec précision et rapidité, la proportion d'atteinte réelle d'une bactérie, il serait souhaitable d'utiliser un marqueur biochimique caractéristique tel que [<sup>35</sup>S] méthionine, utilisé pour le marquage des protéines. Ce marquage facilite l'identification des polypeptides les plus activement touchés et permet d'apprécier s'il y a synthèse de molécules témoins de l'état de stress. L'identification de celles-ci est indispensable pour une analyse fine des premiers événements se déroulant lors d'un traitement thermique. Si la coloration argentique donne une bonne vision de la répartition polypeptidique totale d'un matériel biologique, par contre une étude fluorographique du même matériel après marquage spécifique permet d'apprécier les polypeptides synthétisés.

Dans cette étude préliminaire, on est en présence d'un nombre très important de différences entre les profils, ce qui rend très difficile l'appréciation des phénomènes de choc thermique et la détermination du niveau réel d'atteinte des protéines. Il serait souhaitable de s'intéresser seulement à quelques protéines caractéristiques par un marquage radioactif, de chercher les nouvelles protéines synthétisées (protéines HSP) induites par un traitement thermique et de déterminer si cette synthèse continue après plusieurs croissances dans des conditions optimales. Cette étude peut être réalisée par une analyse quantitative des fluorographies d'électrophorèses bidimensionnelles des protéines synthétisées au cours de la croissance des bactéries ayant résisté au choc du traitement thermique. Ainsi pourrait-on répondre à la question : la reprise normale de la croissance après traitement est-elle corrélée à une absence de synthèse des protéines HSP?

## **CONCLUSION GÉNÉRALE**

## CONCLUSION GENERALE

---

Six souches bactériennes isolées de filets et de terrines de poisson après pasteurisation ont été étudiées, tant du point de vue de leur physiologie de croissance que de leur thermorésistance (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* 1 & 2, *Micrococcus varians* et *Pseudomonas paucimobilis*). L'étude a été faite, suivant le cas, sur des filets de lieu noir ou sur un milieu artificiel composé d'extraits solubles de poisson (milieu Fish).

Dans la première partie de cette recherche, on a réalisé les cinétiques de croissance de ces six souches bactériennes, isolées de filets ou terrines de poissons après pasteurisation, en étudiant particulièrement deux facteurs : température et pH. Ces cinétiques révèlent l'importance de la température sur le développement de ces bactéries mésophiles, ce qui est en particulier intéressant pour allonger la durée de vie des produits conservés à basse température; la durée de la phase de latence est toujours supérieure à 3 jours aux températures inférieures ou égales à 7°C. L'étude du deuxième facteur montre bien que pour ces bactéries, les pH extrêmes semblent intéressants, mais peut-être difficilement applicables industriellement. En combinant pH acide (c'est à dire voisin de 5,5) et basse température (+ 2°C), l'évolution microbienne est arrêtée durant 12 semaines (durée de l'expérimentation), mais ces conditions ne semblent pouvoir être appliquées qu'à certaines préparations acides. Il faut noter que dans des conditions plus habituelles, par exemple à pH 6,4 et à +2°C, le développement de certaines bactéries psychrotrophes (*Pseudomonas paucimobilis*) commence dès le 3ème jour.

Pour bien s'assurer de la thermorésistance de ces bactéries, on a effectué l'étude complète de chacune d'elle, dans le milieu Fish, et on a calculé la valeur pasteurisatrice minimale à appliquer pour détruire l'ensemble de ces bactéries. On a déterminé les 2 bactéries les plus thermorésistantes : il s'agit d'*Enterococcus faecium* et de *Pseudomonas paucimobilis*. Le temps de réduction décimale à 60°C est de 6,5 minutes pour *Enterococcus faecium* et 5,5 minutes pour *Pseudomonas paucimobilis*. Les autres bactéries étudiées ont des temps de réduction moins importants dans ce milieu, particulièrement les bactéries présumées pathogènes, qui disparaissent en premier lors d'un traitement à 60°C : *Staphylococcus aureus* est la première bactérie détruite lors d'un traitement thermique ( $D_{60} = 1,3$  minute et  $z = 6,2^\circ\text{C}$ )

ensuite *Yersinia enterocolitica* 1 & 2 avec les caractéristiques respectives ( $D_{60} = 1,6$  minute et  $z = 7,4^{\circ}\text{C}$ ) et ( $D_{60} = 1,6$  minute et  $z = 8^{\circ}\text{C}$ ). Pour détruire de façon significative la bactérie de référence (*Enterococcus faecium*), et par conséquent la quasi-totalité des bactéries non sporulées, il faut appliquer une valeur pasteurisatrice minimale  $P_{70}^{9,6} = 5,31$  minutes dans le milieu Fish.

Par la suite, on s'est intéressé au comportement de ces bactéries dans des filets de lieu noir après pasteurisation à  $60^{\circ}\text{C}$ , en fonction du pH et de la température de conservation. Les résultats montrent que le traitement thermique influence la physiologie de croissance des micro-organismes : avec la même population initiale, le temps de développement de la contamination sous vide est 2 fois moins long dans les échantillons non traités que dans les échantillons traités. Il faut en moyenne deux semaines dans des températures de réfrigération ( $+ 2^{\circ}\text{C}$ ) pour atteindre  $3 \cdot 10^5$  bactéries / g, alors qu'une conservation à  $+ 7^{\circ}\text{C}$  équivaut à une rupture de la chaîne du froid et que dans ce cas, il faut seulement 3 jours pour atteindre cette concentration. L'application d'un tel traitement n'assure aux produits qu'une durée de vie limitée. Dans les plats cuisinés sous vide, d'autres formes de contamination sont également à craindre, en particulier par des spores de *Clostridium botulinum* E.. De plus, dans le cas de filets de poisson, un tel traitement ne permet probablement pas l'inactivation en proportion suffisante des enzymes, notamment des protéases, qui peuvent résister au traitement de pasteurisation si celui-ci est insuffisant, et qui dégradent alors les produits.

En dernier lieu, des essais préliminaires ont été réalisés pour mettre au point un protocole d'extraction des protéines cytoplasmiques des bactéries subissant un choc thermique: l'analyse électrophorétique de ces protéines révèle que celles-ci subissent des modifications biochimiques dues au traitement thermique.

L'étude prédictive de la multiplication des bactéries mésophiles sélectionnées met en évidence que dans les mêmes conditions de température et de pH, l'ensemble des bactéries ont des comportements voisins; de plus, à  $2^{\circ}\text{C}$ , la croissance est ralentie, voire inhibée à des pH inférieurs à 5,5 ou voisins de 8,2. L'évolution de la contamination par ces bactéries dans des filets de lieu noir est relativement plus rapide dans des échantillons dont le pH initial n'a pas été modifié. Afin que la conduite des cuissons à l'aide des valeurs pasteurisatrices soit pratique au niveau industriel, il serait préférable de définir des valeurs pasteurisatrices communes à tous les produits fabriqués.

L'ensemble des constatations qui précèdent permet d'estimer que pour assurer aux préparations cuites sous vide à base de produits de la mer, et en particulier aux plats cuisinés, une conservation de quelques semaines entre  $0$  et  $3^{\circ}\text{C}$ , il est nécessaire d'avoir des préparations dont le pH est voisin des pH cités ci-dessus, et d'appliquer des valeurs pasteurisatrices



convenables supérieures à celle que l'on a définie ici : ainsi sera-t-il possible de détruire les formes de flore végétative, d'inhiber le développement des spores et de détruire également des enzymes, qui peuvent résister au traitement thermique si celui-ci est insuffisant.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

---

ABABOUCHE L., AFILAL M.E., BENABDELJELIL H., BUSTA F.F. (1991)

Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25 - 28 degrees C) and in ice.

Int. J. Food Sci. Technol., 26, 3, 297-306.

ABGRALL B. (1988)

Etude de la microflore des différents aliments et ses effets. Poissons et autres produits de la mer.

Microbiologie alimentaire 1 -Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires.

Ed. Bourgeois C.M., Mesclé J.F. et Zucca J. Tech. et Doc. Lavoisier. Apria, 251-265.

ADAMS R., LERKE P., FARBER L. (1964)

Bacteriology of spoilage of fish muscle, incidence of spoilers during spoilage.

J. Appl. Microbiol. 12, 277-279.

AFNOR. (1978) (2)

Directives générales pour la recherche et le dénombrement de *Staphylococcus aureus*.

Norme NF V 08-014

ALDOVA E., SOBOTKDAVA J., BREZINOVA A., CERNA J., JANECKOVA M., PEGRIMKOVA J., POKORNA V. (1970)

*Yersinia enterocolitica* in water and foods.

Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig B, 173, 464-470.

ALLWOOD M.C., RUSSEL A.D. (1970)

Mechanisms of thermal injury in nonsporulating bacteria.

Adv. Appl. Microbiol., 12, 89-119.

ALONSO J. M., BERCOVIER H., SERVAN J., BOURDIN M., MOLLARET H.H. (1976)

Contribution à l'étude épidémiologique des infections à *Yersinia enterocolitica*. II-Enquête écologique.

Méd. et Mal. Infect., 6, 434-441.

AMAHA M., et ORDAL Z.J. (1957)

Effects of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *B. coagulans* Var *thermacidurans*.

J. Bacteriol. 75, 596-604.

- ANDERSON D.G., McKAY L.L. (1983)  
Simple and rapid method for isolation of large plasmid DNA from lactic *Streptococci*.  
Appl. Environ. Microbiol., 46, 549-552.
- ANGELOTTI R., HALLE H.E., FOTER M.J., LEWIS K.H. (1962)  
Gélose Sulfadiazine-Polymyxine-Sulfite (SPS)  
Appl. Microbiol., 10, 193-199.
- ANGELOTTI R., MARYANSKI J.H., BUTLER T.F., PEELER J.T., CAMPBELL J.E. (1968)  
Influence of spore moisture content on the dry heat resistance of *Bacillus subtilis* Var. *Niger*.  
Appl. Microbiol., 16, 735-745.
- A.P.H.A. (1967)  
Standard methodes for the examination of dairy products.  
12th Ed., 1967, New York, 232-233,
- ARYANTA R.W., FLEET G.H., BUCKLE K.A. (1991)  
The occurrence and growth of micro-organisms during the fermentation of sausage.  
Int. J. Food Microbiol. 13, 2, 143-155.
- ATTEIA M., PRADEL M. (1990)  
Eléments d'analyse numérique.  
Ed. Cepadues, 154 p.
- BAIRD-PARKER A.C. (1962)  
Gélose de Baird Parker (BP)  
J. Appl. Bacteriol, 25, 12-19
- BAKHVALOV N. (1976)  
Méthodes numériques. Analyse algèbre, équation différentielle ordinaire.  
Ed. Mir. Moscou, 606 p.
- BALL C.O. (1923)  
Determining by methods of calculation on the time necessary to process canned foods  
Introduction to the thermal processing of foods.  
Avi. Publ. Com. Inc. (1961), 1, 935-1004.
- BALL C.O., OLSON F.C.W. (1957)  
Sterilization in food technology. Theory, practice and calculations.  
Mc Graw-Hill, New-York.
- BAMA B. (1985)  
Essai de conservation du poisson frais conditionné sous vide par les ferments lactiques.  
Mémoire I.S.P.A. de Rennes.

- BANWART G. J. (1981)  
Basic Food Microbiology.  
Avipublish. Comp. Inc.
- BARBOUR E.A., PRIEST F.G. (1986)  
The preservation of *Lactobacilli* : a comparison of three methods.  
Lett. Appl. Microbiol., 2, 69-71.
- BARTLEY T.D., OUAN T.J., COLLINS M.T., MORRISON S.M. (1982)  
Membrane filter technique for the isolation of *Yersinia enterocolitica*.  
Appl. Environ. Microbiol., 43, 829-834.
- BEATTY S.A., GIBBONS N.E. (1937)  
The measurement of spoilage in fish.  
J. Bio. Bd. Can. 3, 77-91.
- BEERENS H. (1980)  
Observations relatives au document ISO / TC 34 / SC 6 N 168: Dénombrement de *Clostridium perfringens*.
- BEUCHAT L.R. (1983)  
Influence of  $a_w$  on growth, metabolic activities and survival of yeasts and molds.  
J. Food Prot., 46, 135.
- BIGELOW, W.D. (1921)  
Infections diseases, 24, 528.
- BLOCHER J.C., BUSTA F.F., SOFOS J.N. (1982)  
Influence of potassium sorbate and pH on ten strains of type A and B of *Clostridium botulinum*.  
J. Food Sci., 47, 2028.
- BLUM H., BEIER H., GROSS H.J. (1987)  
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.  
Electrophoresis, 8, 93-99.
- BOER DE F. (1986)  
Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from foods. Proceedings of Veterinary medicine Robert von Ostentag.  
Oraniendruck GmbH, Berlin, 841-884.
- BOND U., SCHLESINGER M.J. (1987)  
Heat shock proteins and development.  
Adv. in Genet., 24, 1-29.
- BOND W.W., FAVERO M.S., PETERSEN N.J., MARSHALL J.H. (1970)  
Dry-heat inactivation kinetics of naturally occurring spore populations.  
Appl. Microbiol., 20, 573-578.

BOURGEOIS C.M. (1979)

Le contrôle microbiologique et son incidence sur la qualité hygiénique et la conservation des produits.

Bull. ADRIA, 6, 3, 5-12.

BREED S.R., MURRAY E., SMITH N.R. (1974)

Bergey's Manual of determinative bacteriology, 8th Edition.

Tindall and Co., London.

BREMNER H.A.; STATHAM J.A., (1983)

Spoilage of vacuum chill stored scallops with added *Lactobacilli*.

Food technology in Australia, 35, 284.

BROCK T.D., MADIGAN M.T. (1988)

Biology of micro-organisms.

Prentice-Hall Int., 9, 315-356.

BUSTA F.F. (1967)

Thermal inactivation characteristics of bacterial spores at ultra-high temperature.

Appl. Microbiol., 15, 640-645.

BUTTIAUX R., MOSSEL D.A.A. (1961)

The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water.

J. Appl. Bacteriol., 24, 353.

CAOLARI A., CAMPANINI M. (1973)

Resistenze termica in *lactobacillaceae*.

Industria Conserve, 48, 140-143.

CARLIER V. (1983)

Etude de quelques paramètres du pH ultime des viandes de bovins.

R.T.V.A., 185, 3.

CASMAN E.P., BENNETT R.W. (1965)

Determination of *Staphylococcal enterotoxin* in food.

Applied Microbiol., 13, 181.

CASTELL C.H., NEAL W.E., DALE J. (1973)

Comparison of changes in trimethylamine, dimethylamine and extractable protein in iced and frozen gadoid fillets.

J. Fish. Res. Board Can. 30, 8: 1246-1248.

CATTEAU M., KREMBEL C., WAUTERS G. (1985)

*Yersinia enterocolitica* et crudités.

Sci. Aliments, 5, n° hors série.

CERF O. (1977)

Tailing of survival curves of bacterial spores.

J. Appl. Bacteriol., 42, 1-19.

- CERF O., BERGERE J.L., HERMIER J., (1967)  
Thermorésistance des spores de *Clostridium tyrobutyricum* et *Clostridium butyricum*.  
J. Dairy Res., 34, 221-229.
- CERF O., DOUSSET X., BROSSARD J. (1988)  
Pasteurisation et stérilisation thermique..  
Microbiologie alimentaire 1: Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires.  
Ed. Bourgeois C.M., Mescle J.F. et Zucca J. Tech. et Doc. Lavoisier. APRIA. 308-328.
- CHANDRASEKHARAN M., LAKSHMANAPERUMALSAMY P., CHANDRAMOHAN D.  
(1991).  
Combined effect of environmental factors on spoilage bacteria.  
Fish. Technol.
- CHAPMAN G.H. (1945)  
The significance of sodium chloride in studies of Staphylococci.  
J. Bact. 50, 201-203.
- CHAZAL G. (1983)  
Emballage et conditionnement en restauration, nature et importance.  
La Restauration; I.T.S.V., 245-255.
- CHEFTEL J.C., CHEFTEL H. (1977)  
Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, Vol. 2.  
Tech. et Doc. Lavoisier.
- CHEFTEL H., THOMAS G., (1963)  
Principes et méthodes pour l'établissement des barèmes de stérilisation des conserves  
alimentaires.  
Ets. J.J. Carnaud. Forges de Basse Indre. Bull. n°14.
- CHIRIFE J., FONTAN C.F. (1982)  
Water activity of fresh food.  
J. of Food Sci., 47, 661.
- CONWAY E.J. (1962)  
Determination of volatile amines. Microdiffusion analyses and volumetric error, 5th Ed.  
Ed. Crosby, Lockwood and Son, London. 195-200.
- COOK A.M., GILBERT R.J. (1968)  
Factors affecting the heat resistance of *B. stearothermophilus* spores.  
J. Food Technol., 3, 285-302.
- COULON-BUBLEX M., MATHELIN J. (1991)  
Variations des taux de synthèse des protéines de choc thermique hsp70 entre la ponte et  
neurula chez l'embryon diapausant de ver à soie *Bombyx mori*.  
Séricologia, 31, 2, 275-300.

- CRAIG E.A. (1985)  
The heat-shock response.  
C.R.C. Crit. Rev. Biochem., 18, 239-280.
- CURRAN D.M., TEPPER B.J., MONTVILLE T.J. (1990)  
Use of bicarbonate for microbial control and improved water-binding capacity in cod fillets.  
J. Food Sci., 55, 6, 1364-1566.
- DE BOOR (1978)  
A Practical Guide to Splines.  
Springer-Verlag
- DIDOU S. (1985)  
Le conditionnement à la carte, emballage de la viande sous vide.  
R.T.V.A..
- DORSO Y. (1978)  
Validité d'une méthode rapide d'analyse bactériologique des plats cuisinés.  
Thèse Doctorat vétérinaire, E.N.V. Maisons-Alfort, 130 p.
- DOYLE M.P., HYGRAHL M.B. (1983)  
Improved procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from meats.  
Suppl. Environ. Microbiol. 45, 127-135.
- DUC-JACQUET M. (1968)  
Cours d'analyse numérique. Chap. 3. Résolution de quelques problèmes d'analyse numérique linéaire à l'aide de perturbations par des matrices antisymétriques.  
IMAG, 116 p.
- DREYFUSS G., SWANSON M.S., PINOL-ROMA S. (1988)  
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation.  
TIBS, 13, 86-90.
- DRIARD C. (1974)  
Méthode de détermination de la valeur stérilisatrice des conserves appertisées. Etudes des facteurs intervenant dans la thermorésistance des spores bactériennes.  
Mémoire de fin d'études. Edition : Institut Appert, Paris.
- DUQUENOY F., (1993)  
Contribution à la modélisation et à l'identification d'une croissance bactérienne.  
Thèse de Doctorat d'Université, U.S.T.L., 82 p.
- DURA J.M. (1981)  
Hsp synthesis is induced only after treatment at blastoderm in later stages in development.  
Mol. Gen. Genet., 184, 73-79.
- DYER W.J., MOUNSEY Y.A. (1945)  
Amines in fish muscle IV. Development of trimethylamine and other amines.  
J. Fish. Res. Bd. Can. 6, 359.



- EDMUNDS W.J., EITENMILLER R.R., (1975)  
Effect of storage time and temperature on histamine content and histidine decarboxylase activity of aquatic species.  
J. Food Sci., 40, 516-519.
- EDWARDS P.R., EWING W.H. (1976)  
Identification of *Enterobacteriaceae*, 2nd Ed.  
Burgess Pub. Co., Minneapolis.
- EDWARDS S.T., SANDINE W.E. (1981)  
Symposium on microbial metabolites of importance in dairy products. Public health significance of amines in cheese.  
J. Dairy Sci., 64, 2431-2438.
- EINARSSON H., VALDIMARSSON G. (1991)  
Conservation de poisson avec glace sous atmosphère modifiée.  
Rev. Gén. Froid., 81, 2, 31-34.
- EINTENMILLER R.R., ORR H.J., WALLIS W.W. (1982)  
Histamine formation in fish : microbiological and biochemical conditions.  
Chemistry and biochemistry of marine food products.  
Avi Pub. Co. Inc, Westport, Connecticut.
- EL-BISI H.M., ORDAL Z.J. (1956)  
The effect of certain sporulation condition on thermal death rate of *B. Coagulans* var thermoacidurans.  
J. Bacteriol., 71, 16.
- ENFORS S.O., MOLIN G., TERNSTRÔM A. (1979)  
Effect of packaging under carbon dioxide, nitrogen or air on the microbial flora of pork stored at 4°C.  
J. Appl. Bacteriol., 74, 197-208.
- ETOA F.X. (1983)  
Miniaturisation de la méthode biologique de détermination de la valeur stérilisatrice dans les conserves.  
D.E.A. Université Paris VI. Edition : Institut Appert, Paris.
- FERNANDEZ SALGUERO J., MACKIE I.M. (1979)  
Histidine metabolism in mackerel. Studies on histidine decarboxylase activity and histamine formation during storage of flesh and liver under sterile and non sterile conditions.  
J. Food Technol., 14, 131-139.
- FIEVET-DESREUMAUX C. (1980)  
Fractionnement et analyse des lipoprotéines sériques humaines : nouvelles méthodes d'étude et applications.  
Thèse de Doctorat d'Etat, U.S.T.L.

- FRANCIS D.W., SPAULDING P.L., LOVETT J. (1980)  
Enterotoxin production and thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* in milk.  
Appl. Environ. Microbiol. 40, 174-176
- GAUTHIER R. (1983)  
Chaîne chaude, chaîne froide, technologie et hygiène.  
La Restauration; I.T.S.V., 195-206.
- GAZE J.E., (1985)  
The effect of oil on the heat resistance of *Staphylococcus aureus*.  
Food Microbiol., 2, 277-283.
- GENNARI M., CANTONI C., COLOMBO A., (1981)  
*Pseudomonas spp.* and fish deterioration.  
Industrie alimentari, 20, 10, 685-690.
- GEORGALA D.L. (1957)  
Changes in the skin flora of cod after washing and icing.  
J. Appl. Bacteriol. 20, 23-29.
- GIBSON B. (1973)  
The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative micro-organisms.  
J. Appl. Bact., 36, 365-376.
- GILLESPIE B. (1975)  
The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage.  
J. Appl. Bact., 39, 91-100.
- GILLESPIE N.C. and MACRAE I.C. (1975)  
The bacterial flora of some Queensland fish and its ability to cause spoilage.  
J. Appl. Bact. 39, 91-100.
- GILLIAN S.E., SPECK M.L. (1975)  
Inhibition of psychrotrophic bacteria by *Lactobacilli* and *Pediococci* in nonfermented refrigerated food.  
J. Food Sci., 40, 903.
- GOULD G.W., DRING G.L. (1975)  
Mechanisms of spores heat resistance.  
Adv. Microbiol. Physiol., 11, 137-164.
- GOURDIN A., BOUMHRAT M. (1983)  
Approximation de données numériques par des fonctions analytique.  
Méthodes des moindres carrés, 299-413.
- GOUSSAULT B. (1988)  
Cuisson sous vide : vers les basses températures.  
R.I.A., 30-33.

- GOUYGOU J.P., MARTIN C., SINQUIN C., DURAND P. (1989)  
 Determination of biogenic amines in fish.  
 Oceanis. 15, 4 : 599-604.
- GUNSALUS I.C. (1979)  
 The bacteria : treaties on structure and function.  
 Ed. Sokatch, VII, 219-480.
- HAN Y.W. (1975)  
 Death rates of bacterial spores : nonlinear survivor curves.  
 Can. J. Microbiol., 21, 1464-1467.
- HANNA M.O., HALL L.C., SMITH G.C., VANDERZANT C. (1980)  
 Inoculation of beef steaks with *Lactobacillus species*, before vacuum packaging. 1. Microbial considerations.  
 J. Food Prot., 43, 837.
- HANNA N.H., STEWART J.C., CARPENTER Z.L., VANDERZANT C. (1977)  
 Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* in skim milk.  
 J. Food Sci., 21, 4, 1134-1136.
- HANSEN N.H., RIEMANN H. (1963)  
 Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms.  
 J. Appl. Bacteriol., 26, (3), 314-333.
- HARNULV B.G., JOHANSSON M., SNYGY B.G. (1977)  
 Heat resistance of *B. stearothermophilus* spores at different water activities.  
 J. Food Sci., 42, 91-93.
- HAUSNER O., HAUSNER S., TONDL F. (1973)  
 Incidence des souches de *Yersinia enterocolitica* indole positive en Bohême du Nord.  
 C.S. Epidémiol. Microbiol. Immunol., 22, 73-78.
- HERBERT R.A. (1975)  
 Microbial ecology of fish soilage.  
 Process Bioch., 10, 9-11.
- HILBERT J.L., MARTIN F. (1988)  
 Regulation of gene expression in ectomycorrhizas.I. Protein changes and the presence of ectomycorrhiza-specific polypeptides in the *Pisolithus-Eucalyptus*.  
 New Phytol., 173, 339-346.
- HOBBS G. (1982)  
 Changes in fish after catching.  
 Fish-Handling and Processing. .  
 Ed. Arkten A., Mackie I.M., Meritt J.H., Windsor M.L., 20-27.

- HOBBS G., HODGKISS W. (1982)  
The bacteriology of fish handling and processing. Development in food microbiology 1.  
Ed. Davies R., Applied Science Publishers. 71-117.
- HOCHSTRASSER D.F., HARRINGTON M.G., HOCHSTRASSER A.C., MILLER M.J.,  
MERRIL C.R.(1988).  
Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis.  
Anal. Biochem., 173, 424-435.
- HOLLINGWORTH T. A. JR, KAYSNER C.A., COLBURN K.G., SULLIVAN J.J.,  
ABEYTA C. JR, WALKER K.D. 1991.  
Chemical and microbiological analysis of vacuum-packed, pasteurized flaked imitation  
crabmeat.  
J. Food Sci., 56, 1, 164-167.
- HORSLEY R.W. (1977)  
A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranches including methods for its  
analysis.  
J. Fish Biol. 10, 529-553.
- HSIEH F., ACOTT K., LABUZA T.P. (1976)  
Death kinetics of pathogens in a pasta product.  
J. Food Sci., 41, 516-519.
- HUDSON, ARNOLD S., DUANE BROWN W.  
Histamine toxicity from fish product.  
Advances in food research, 24, 113-155.
- HUGUES B. (1975)  
Contribution à l'étude de méthodes de détection de *Salmonella* dans les eaux usées.  
Thèse Docteur-Ingénieur. Nancy I, 219 p.
- HUI Y.I. (1991)  
Food preservation techniques.  
Encyclopedia of Food Sci. Technol., Vol 2, 1100-1102.
- HUI Y.J., TAYLOR S.L. (1983)vol. 2 -  
High pressure liquid chromatographic determination of putrefactive amines in foods.  
J. Assoc Anal. Chem., 66, 4, 853-857.
- HURST A., HUGHES A., (1983)  
The protective effect of some food ingredients on *Staphylococcus aureus* MF 31.  
J. Appl. Bacteriol., 55, 81-88.
- HUSS H.H. (1988)  
Le poisson frais : qualité et altération de qualité.  
FAO: Pêches n° 29.

I.C.M.S.F. (1974)

Sampling for microbiological analysis : principles and specific application.

Micro-organisms in food, Vol. 2.

University of Toronto Press, 213 p.

INGHAM S.C. (1989)

Lactic acid dipping for inhibiting microbial spoilage of refrigerated catfish fillet pieces.

J. Food qual.

ISEMBERG H.G. et Al. (1970)

Milieu B.E.A. (Bile - Esculine - Azote)

Appl. Microbiol., 433-436.

JANIN F., De DUYSER M.L., LAPEYRE C., FEINBERG M. (1983)

Radioimmunological quantitative determination of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in various food.

Sci. des Aliments, 3, 397-412.

JAY J.M. (1986)

Modern Food Microbiology.

Ed. Van Nostrand Company.

KAPPERUD G. (1977)

*Yersinia enterocolitica* and *Yersinia* like microbes isolated from mammals and water in Norway and Denmark.

Acta Pathol. Microbiol. Scand., 85, 129-135.

KAPPERUD G., JONSSON B. (1978)

*Yersinia enterocolitica* et bactéries apparentées isolées à partir d'écosystèmes d'eau douce en Norvège.

Méd. et Mal. Infect., 8, 500-506.

KIMURA B., MURAKAMI M., FUJISAWA H. (1991)

Microbial flora of jack mackerel *Trachurus japonicus* fillets stored in retail packages containing different gas atmospheres at 5 degrees C.

Nippon Suisan Gakkaishi 57, 3, 573.

KOUJIMA I.H. (1978)

Adaptational change in proline and water content of *S. aureus* after alteration of environmental salt concentration.

Appl. Env. Microbiol., 35, 467.

KRAMER G.F., BAKER J.C., AMES B. (1988)

Near-UV stress in *Salmonella typhimurium*: 4-thiouridine in tRNA, ppGpp, and ApppGpp as components of an adaptive response.

J. Bacteriol., 170, 2344-2351.

- LACHICA R.V.F. (1971)  
Metodermatic agar - Diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity.  
J. Appl. Microbiol., 21, 585
- LAEMMLI U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature, 227, 680-685.
- LANNELONGUE M., FINNE G., HANNA M.O., NICKELSON R., VANDERZANT C. (1982)  
Microbial and chemical changes during storage of swordfish steaks in retail packages containing CO<sub>2</sub> enriched atmospheres.  
J. Fd. Protect., 45 (13), 1197-1203.
- LASSEN J. (1972)  
*Yersinia enterocolitica* in drinking. Scand.  
J. Infect. Dis., 4, 125-127.
- LAURENT R. (1985)  
Modélisation et identification des systèmes complexes : application à l'épuration biologique des eaux.  
Thèse de Doctorat d'Etat, U.S.T.L.
- LAURENT R., POVY L. (1979)  
Sur la modélisation des eaux usées.  
C.R. Acad. Sc, Paris, 288, Série A, 315-318.
- LEBERT F., ROSSET R. (1974)  
Plats cuisinés réfrigérés ou congelés : technologie et hygiène.  
Rev. Gén. Froid. II. 1127-1143.
- LECLERC H. (1975)  
Microbiologie générale, 2ème Ed.  
Doin, Paris, 280 p.
- LECLERC H., MOSSEL D.A.A. (1989)  
Microbiologie. Le tube digestif, l'eau et les aliments, IV  
Doin, Paris, 472-476.
- LEGRAND M., JOUVE J.L., DRIEUX H., (1978)  
Quelques résultats du contrôle bactériologique des plats cuisinés à l'avance.  
Rec. Méd. Vét. d'Alfort, 154, (9), 764-766.
- LE MINOR L. (1972)  
Le diagnostic de laboratoire des *bacilles* à Gram négatif. *Entérobactéries*. Tome I, 4ème Ed.  
Collection technique de base. Editions La Tourelle, Paris. 227 p.

LEVINSON H.S., HYATT M.T. (1964)

Effect of sporulation medium on heat resistance chemical composition and germination of *B. megaterium* spores.

J. Bacteriol., 87, 876-886.

LINQUIST S.(1986)

The heat shock response.

Ann. Rev. Biochem., 55, 1151-1191.

LISTON J. (1980)

Microbiology in fishery science. Advances in fish science and technology.

Ed. Connell J.J., Fishing News Book Ltd, Farnham, Surrey, England. 138-157.

LISTON J. (1982)

Recent advances in the chemistry of iced fish spoilage. Chemistry and biochemistry of marine food products.

Ed. Martin R., Flick G., Hebard C.E. et Ward D.R.. Avi Pub. Co. Inc., Westport, Connecticut. 27-37.

LODGE R.M., HINSHELWOOD C.N. (1943)

Cité par DUQUENOY F (1993).

J. Chem. Soc., 213.

LOISEAU-MAROLLEAU M.L., ALONSO J.M. (1976)

Isolement de *Yersinia enterocolitica* lors d'une étude systématique des aliments en milieu hospitalier. Considérations épidémiologiques.

Méd. et Mal. Infect., 6, 373-377.

LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951)

Protein measurement with the Folin phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193, 265-275.

MAGNUS C.A., INGLE DEW W.M., Mc CURDY A.R. (1986)

Thermal resistance of *Streptococci* isolated from pasteurized ham.

Can. Inst. Food. Sci. Technol. J., 19, 2, 62-67.

MAGRINI R.C., CHIRIFF J., PARADA J.L. (1983)

A study of *Staphylococcus aureus* growth in model systems and processed cheese.

J. Food Sc., 48, 882.

MAKSIMENKOVA I.A., KARPOCHEVSKIJ L.O. (1985)

Caractéristiques des sols dans des sites naturels de leptospirose, pseudotuberculose et *Yersinia* intestinale.

Pocvivedenic, 10, 107-115.

MALLE P. (1992)

Microbiologie des poissons marins evaluation experimentale de l'altération.  
Thèse Doctorat Microbiol., U.S.T.L., 131 p.

MALLE P., EB P., TAILLIEZ R. (1986)

Determination of the quality of fish by measuring trimethylamine oxide reduction.  
Int. J. Microbiol., 3, 225-235.

MALLE P., TAO S.H. (1987)

Rapid quantitative determination of trimethylamine using steam distillation.  
J. Food. Protect., 50, (9), 756-760.

MANROW R.E., JACOBSON A. (1988)

mRNA decay rates in late-developing *Dictyostelium discoïdum* cells are heterogeneous, and cyclic AMP does not act directly to stabilize cell-type specific mRNAs.  
Mol. Cell. Biol, 8, 4088-4097.

MARINELLI G., D'INNOCENZO C., FABIANI L, LEONI V. (1985)

Application of simplified method for recovery of *Yersinia enterocolitica* from surface waters.  
Appl. Environ. Microbiol. USA, 49, 1346-1349.

McMEEKIN T.A., ROOS T., OLLEY. J. (1991)

Application of predictive microbiology to assure the quality and safety of fish and fish products.  
Int. J. Food Microbiol. 15, 13-32.

McMULLEN L., STILES M.E. (1989)

Storage life of selected meat sandwiches at 4°C in modified gas atmospheres.  
J. Food Protect. 52, 11, 792-798.

MÅRDEN P., NYSTRÖM T., KJELLEBERG S., (1987).

Uptake of leucine by a marine Gram-negative heterotrophic bacterium during exposure to starvation conditions.  
FEMS Microbiol. Ecol., 45, 233-241.

MATHESON N.K., McCLEARY B.V. (1985).

Enzymes metabolizing polysaccharides and their application to the analysis of structure and function in glycans.  
The Polysaccharides, ASPINALL G.O., Academic Press, 3, 2-94.

MELIS R. (1981)

La recherche de *Yersinia enterocolitica* dans les eaux de surface.  
J. Fr. Hydr., 12, 187-194.

MELIS R. , MOLLARET H.H. (1981)

Présence de *Yersinia enterocolitica* dans les eaux. Etat actuel des connaissances.  
J. Fr. Hydr., 12, 175-186.



- MERGUI A. (1985)  
Recherches sur *Yersinia enterocolitica*. Enquête épidémiologique. Comportement et devenir dans le lait et les produits laitiers.  
Thèse 3ème cycle Sciences Aliments, U.E.R. Caen., 182 p.
- MESCLE J.F., ZUCCA J. (1988)  
Le comportement des micro-organismes en milieu alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires.  
Microbiologie alimentaire 1 Lavoisier, 9 48.
- MICHIELS L., VIGNERON J., LUCAS J.C. (1978)  
Facteurs divers influençant la thermorésistance des spores bactériennes.  
Communication présentée au VIIème Congrès International de la Conserve, Tunis.
- MOATS W.A., DABBAH R., EDWARDS V.M. (1971)  
Interpretation of nonlogarithmic survivor curves of heated bacteria.  
J. Food Sci., 36, 523-526.
- MULAK V. (1988)  
The pasteurisation of fish products: Influence of thermal process and storage temperature on the shelflife of saithe pasteurized fillets.  
Western European Fish Technologists Association. 18ème Congrès Annuel, Tromsø Norvège.
- MULAK V. (1990)  
La cuisson sous vide de préparations à base de produits de la mer : aspects microbiologiques.  
Thèse Doctorat Microbiologie, U.S.T.L., 145 p.
- MULAK V., EB P., BECEL P., TAILLIEZ R. (1992)  
Bactériologie des produits de la mer. Caractérisation des flores bactériennes après traitement thermique.  
Sci. Aliments, 12, 415-428.
- MURELL W.G., SCOTT W.J. (1966)  
The heat resistance of bacterial spores at various water activities.  
J. Gen. Microbiol., 43, 411-425.
- N. (1976)  
Aspects microbiologiques de l'hygiène des denrées alimentaires.  
Série rapports techniques n°598, Comité Mixte FAO / OMS, OMS, Genève, 114 p.
- NEWTON K., RIGG W. (1979).  
The effect of film permeability on the storage life and microbiology of vacuum-packed meat.  
J. Appl. Bacteriol., 47, 433-441.
- NOTERMANS S., HENVELMAN J., (1983)  
Combined effet of water activity, pH and sub-temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*.  
J. Food Sci., 48, 1832-1840.

- NOTTINGHAM P. (1982).  
Microbiology of carcass meats.  
"Meat Microbiology", M.H. BROWN, Appl. Sci. Publishers, 2, 13-65.
- NOVER L., HELLMUND D., NEUMANN D., SCHARF K.D., SERFLINE E. (1984)  
The heat-shock response of eucaryote cells.  
Bil. Zentrabl. 103, 357-435.
- NYSTRÖM T., OLSSON R.M., KJELLEBERG S., (1991).  
Survival, stress resistance, and alterations in protein expression in the marine *VibrioI* sp. strain S14 during starvation for different individual nutrients.  
Appl. Environ. Microbiol., 58, 1, 55-65.
- O'FARRELL P.H. (1975)  
High resolution two dimensional electrophoresis of proteins.  
J. Biol. Chem., 250, 4007-4021.
- OGUNSUA A.O., ARIAHU C.C., ADEBONA M.B. (1990)  
Post-harvest changes in periwinkle (*Tympanostomus fuscatus*) at tropical ambient storage conditions.  
Lebensm.-Wiss. Technol., 23, 4, 343-348.
- OHLSSON T., (1978)  
Pasteurization of meat, fish and convenience food products.  
Food quality and nutrition.  
Ed. Downey, W.K. Elsevier. 163-188.
- OKUZUMI M., FUKUMOTO I., FUJI T. (1990)  
Changes in bacterial flora and polyamines contents during storage of horse mackerel meat.  
Nippon Suisan Gakkaishi, 56, 8, 1307-1312.
- OKUZUMI M., YAMANAKA H. et al. (1984)  
Changes in numbers of histamine forming bacteria on / in Common mackerel stored a various temperatures.  
Bull. Jap. Soc Sci. Fish., 50, 4, 653-657.
- OREFICE L., TOTI L., GIZZARELLI S., CROCI L. (1989)  
Survie et toxinogénèse de *Yersinia enterocolitica*.  
Microbiol. Aliments Nutrit. 7, 273-277.
- OTT., EL-BISI H., ESSELEN W.B., (1960)  
Thermal destruction of *Streptococcus faecalis* in prepared frozen foods.  
J. Food Sci., 26, 1-10.
- PACE B., CAMPBEL L.L. (1967)  
Correlation of maximal growth temperature and ribosome heat stability.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 57, 1110-1117.

- PANTALEON J., GLEDEL J., CORBION B. (1976)  
*Salmonella* provenant d'animaux et de denrées d'origine animale données épidémiologiques.  
 Méd. et Nutr., 12, 1, 45-47.
- PEDROSA-MANABRITO A., REGENSTEIN J.M. (1990)  
 Shelf-life extension of fresh fish. A review. Part III. Fish quality and methods of assessment.  
 J. Food Qual., 13, 3, 209-223.
- PELLETIER J.P. (1982)  
 Techniques numériques appliquées au calcul scientifique.  
 Ed. Masson, chapitre 7, 367 p.
- PEREIRA J.L., SALZBERG S.P., BERGDOLL M.S. (1982)  
 Effect of temperature, pH and sodium chloride concentrations on production of staphylococcal enterotoxins A and B.  
 J. Food Prot., 45, 14, 1306-1309.
- PETERSON G.L. (1979)  
 Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall.  
 Anal. Biochem. 100, 201-220.
- PETIT M. (1971)  
 Quelques programmes graphiques d'analyse numérique.  
 Thèse 3ème cycle, Informatique, Grenoble, 119p.
- PRALUS G. (1985)  
 La cuisine sous-vide, une histoire d'amour.  
 Ed. origine Pralus, Pouilly sous Charlier, 447 p.
- PROCTOR B.E., NICKERSON J.T.R. (1935)  
 An investigation of the sterility of fish tissues.  
 J. Bact. 30, 377.
- PUROHIT K., STOKES J.L. (1967)  
 Heat labile enzymes in a psychrophilic bacterium.  
 J. Bacteriol., 93, 199-206.
- RAGUENES N. (1988)  
 Les amines biogènes.  
 Microbiologie Alimentaire, 1, 134-147.
- RECHTMAN J., LAPEYRIE L. (1985)  
 Isolement de *Yersinia enterocolitica* d'aliments réfrigérés vendus aux consommateurs.  
 Sci. Aliments 5, n° hors série IV.
- REICHERT J.E., BREMKE H., BAUMGART J., (1979)  
 Zur Ermittlung des Erhitzungseffektes für Kochschinken (F-wert).  
 Die Fleischerei, 8, 624-636.

- ROBERTS T.A., INGRAM M. (1965)  
The resistance of spores of *Clostridium botulinum* to heat and radiation.  
J. Appl. Bacteriol., 28, 125-141.
- ROBISON S.H., MORITA R.Y. (1966)  
Z. Allegem. Mikrobiol., 6, 181-187. (cité par Allwood et Russel 1970).
- ROSSET D.J. (1978)  
Les toxi-infections alimentaires en France de 1970 à 1977.  
Thèse Doctorat Médecine, Paris VI, 100 p.
- ROSSET R., POUMEYROL G. (1986)  
Procédés modernes de préparation de plats cuisinés à l'avance par la cuisson précédant ou suivant le conditionnement sous vide.  
Science Aliments, Hors-Serie IV, 161-167.
- ROZIER J., CARLIER V., BOLNOT F., (1985)  
Bases microbiologiques de l'hygiène des aliments.  
Ed. SEPAIC.
- RUSSEL A.D. (1971)  
The destruction of bacterial spores.  
Inhibition and destruction of the microbial cell.  
Academic Press. London. 451-612.
- SADOFF H.L. (1970)  
Heat resistance of spore enzymes.  
J. Appl. Bacteriol., 33, 130-140.
- SAINCLIVIER M. (1983)  
L'industrie alimentaire halieutique. Vol. 1 : le poisson matière première.  
Bull. Scient. Tech. de l'Ecole Nationale Agronomique et du Centre de Recherche de Rennes.
- SAINCLIVIER M. (1988)  
L'industrie alimentaire halieutique. Vol. 3 : La conservation par des moyens physiques.  
Première partie : conserverie de poissons.  
Bull. Scient. Tech. de l'Ecole Nationale Agronomique et du Centre de Recherche de Rennes.
- SCHEPENS A., DE ROUS A., DEBEVERE J. (1991)  
Melkzuurdecontaminatie en gemodificeerde atmosferverpakking. Effect op de houdbaarheid van rauwe *Penaeus esculentus*.  
Voedingsm. Technol., 24, 13 - 13-15.
- SCHICKELE C. (1971)  
Contribution à la qualité bactériologique des plats cuisinés.  
Thèse Doctorat Pharmacie, Strasbourg I, 107 p.

SCHIEMAN D.A. (1978)

Isolation of *Yersinia enterocolitica* from surface and well waters in Ontario.  
Can. J. Microbiol., 24, 1048-1052.

SCHIEMAN D.A. (1979)

Synthesis of selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*.  
Can. J. Microbiol. 25, 1298-1304.

SCHLEIFER K.H. (1981)

Klassifikation von *Staphylococcus* und *Micrococcus* - Ein Beispiel für die moderne Bakteriensystematik.  
Form. Mikrobiol., 5, 272-278.

SENHAJI A.F. (1973)

Protection des micro-organismes par les matières grasses au cours des traitements thermiques.  
Thèse de Docteur-Ingénieur, Université Paris VII.

SHETTY T.S., SETTY T.M.R. (1990)

Bacteriology of Indian oil sardine (*Sardinella longiceps Valenciennes*) stored in chilled sea water.  
Fish. Technol., 27, 2, 141-144.

SHEWAN J.M. (1962)

The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes.  
Recent Adv. Fd. Sci., 1, 167-193.

SHEWAN J.M. (1971)

The bacteriology of fresh and fishery products. A progress report.  
J. Appl. Bact., 34, (2), 299-315.

SHEWAN J.M. (1977)

The bacteriology of fresh and spoiling fish and biochemical changes induced by bacterial action.  
Handling, processing and marketing of tropical fish.  
Tropical Products Institute, London. 51-66.

SHEWAN J.M., HOBBS G., HODGKISS W. (1960)

The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish.  
J. Appl. Bact. 23, 463-468.

SHEWAN J.M., MURRAY C.K. (1979)

The microbial spoilage of fish with special deference to the role of psychrotrophiles.  
Cold-tolerant microbes in spoilage and the environment.  
Russel A.D. and Fuller R., Academic Press, London. 117-136.

SILLIKER L.M. (1963)

Total counts as indexes of food.  
Microbiol. Quality Foods, 102-112.

- SKOVGAARD N. (1979)  
Bacterial association of and metabolic activity in fish in North-Western Europe.  
Archiv. fur Lebensmittelhygiene. 30, 106-109.
- SOUDAN F., ANQUEZ H., BENEZIT A. (1965)  
Conservation par le froid des poissons, crustacés et mollusques.  
Baillière et fils, Paris.
- SPARADO M., INFORTUNA M. (1968)  
Isolement de *Yersinia enterocolitica* dans une moule (*Mytilus gallaprovincialis*).  
Bull. Soc. Ital., 44, 1896-1897.
- SPENCER R. (1967)  
Heat resistance of micro-organisms.  
Food Manufacture, 42, 6, 29 - 34.
- SPLIOTIS (1983)  
Survie des spores de *B. stearothermophilus* - Influence de l'a<sub>w</sub> et du pH du milieu de suspension pendant la stérilisation thermique et après conservation à température ambiante.  
Thèse Docteur 3ème cycle, Université Paris VII. Edition : Institut Appert, Paris.
- STORCK P. (1973)  
Les aliments surgelés - Etude critique du contrôle bactériologique.  
Thèse Doctorat Pharmacie, Strasbourg I, 151 p.
- STUMBO C.R. (1973)  
Thermobacteriology in food processing, 2nd Ed.  
Academic Press, New-York.
- SUGIYAMA H. (1951)  
Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Cl. Botulinum*.  
J. Bacteriol., 62, 81-96.
- SUTHERLAND J.P., PATTERSON J.T., MURRAY J.G. (1975)  
Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef.  
J. Appl. Bact. 39, 227-237.
- TARR H.L.A. (1939)  
The bacterial reduction of trimethylamine oxide to trimethylamine.  
J. Fish Res. Bd. Can. 4, 367-377.
- TAYLOR L.Y., CANN D.D., WELCH B.J. (1990)  
Antibotunal properties of nisin in fresh fish package in an atmosphere of carbon dioxide.  
J. food prot. 55, 11, 953-957.
- THATCHER F.S. (1955)  
Microbiological standards for foods : their function and limitations.  
J. Applied Bacteriol., 18, 449

- THATCHER F.S., CLARK D.S. (1968)  
Micro-organisms in food : their signification and methods of enumeration.  
University of Toronto Press, Canada, 234 p.
- TIECCO G., TAN TILLO G., FRANCIOSCA E., DENATALE G., (1984)  
Ricerche dell'istamina e di altre poliamine in sgombri e sardine conservati a varie temperature.  
Industrie Alimentari, 1, 8 Gennaio.
- TOMA S. (1973)  
Survey on the incidence of *Yersinia enterocolitica* in the province of Ontario (Oyster).  
Can J. Publ. Heath, 64, 477-487.
- TOQUIN M.T. (1985)  
Origine des *Yersinia* isolées à partir d'escalopes de volailles.  
Sci. Aliments, 5, 85-91.
- VALIN C., LACOURT A. (1980)  
Etude comparée de différents modes de conditionnement des viandes bovines hachées et réfrigérées.  
IAA, 97, 3, 123-129.
- VIDON D.J.M., DELMAS C.L.L. (1981)  
Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk in Eastern France.  
Appl. Environ. Microbiol., 41, 355-359.
- WAUTERS G. et JANSSENS M. (1976)  
Portage de *Yersinia enterocolitica* par le porc de boucherie. II - Recherche de *Yersinia enterocolitica* sur des langues de porc achetées en boucherie.  
Méd. et Mal. Infect., 12, 517-519.
- WEAGANT S.D. (1983)  
Modified enrichment broth for isolation of *Yersinia enterocolitica* from non food sources.  
Appl. Environ. Microbiol., 45, 468-471.
- YAMANAKA H. (1990)  
Polyamines as potential indices for freshness and decomposition of saury pike (*Cololabis saira*) and scallop (*Patinopecten yessoensis*).  
Chilling and freezing of new fish products.  
Paris : Institut International du Froid. 153-159.
- ZEN YOGI (1970)  
In Mensire 1982. Anonyme-Cahiers du Centre National des Yersinia.  
Directeur : Prof. Mollaret H.H., Inst. Pasteur, Paris.
- ZIVY M. (1986)  
Recent progresses in two-dimensional electrophoresis,  
Influence des ampholytes sur la révélation des protéines au nitrate d'argent.  
Galteau M.M., Siest G., éd., Presses Universitaires de Nancy, 69-72.

### Réglementation des plats cuisinés à l'avance sous vide:

#### principaux textes

- (I) Arrêté du 26 Juin 1974 (J.O. du 16 Juillet 1974 - tiré à part n° 74163), réglementant les conditions d'hygiène relatives à la préparation, la conservation, la distribution et la vente des plats cuisinés à l'avance.
- (II) Circulaire du 3 Mars 1975, publiée pour application de l'arrêté du 26 Juin 1974 en vue de l'attribution de la marque de salubrité.
- (III) Circulaire du 4 Avril 1980, relative aux critères microbiologiques.
- (IV) Arrêté du 18 Juin 1980, réglementant les conditions d'hygiène applicables aux denrées animales ou d'origine animale dans les entrepôts frigorifiques.
- (V) Circulaire du 27 Juin 1980, relative aux conditions d'hygiène applicables aux matériels.
- (VI) Arrêté du 26 Septembre 1980, (J.O. du 15 Octobre 1980), réglementant les conditions d'hygiène applicables dans les établissements où sont préparés, servis ou distribués des aliments comportant des denrées animales ou d'origine animale.
- (VII) Circulaire du 5 Janvier 1981 pour application de l'arrêté du 26 Septembre 1980.
- (VIII) Notes de service du 5 Octobre 1984 n° 8105 concernant le conditionnement sous vide en restauration et du 26 Novembre 1985 n° 8145 concernant le conditionnement sous vide par les charcutiers détaillants.
- (IX) Note de service du 31 Mai 1988 n° 8106 et annexe, concernant la prolongation de la durée de vie des plats cuisinés à l'avance; modification du protocole permettant d'obtenir les autorisations, prenant pour référence l'arrêté du 26 Juin 1974.
- (X) Brochures "Hygiène Alimentaire - Textes Généraux" éditées par le Journal Officiel, reprenant l'ensemble des textes principaux sous les numéros 1488. I et 1488. II.
- (XI) Arrêté ministériel du 28 décembre 1992 concernant les conditions d'hygiène applicables dans les établissements de manipulation des produits de la pêche.





J.O. du 16 JUILLET 1974

///- R R E T E DU 26 JUIN 1974

-----  
REGLEMENTANT LES CONDITIONS D'HYGIENE RELATIVES A LA PREPARATION, LA  
CONSERVATION, LA DISTRIBUTION ET LA VENTE DES PLATS CUISINES  
A L'AVANCE  
-----

ARTICLE 1er :

Les dispositions du présent arrêté concernant toutes les préparations culinaires composées pour tout ou partie de denrées visées à l'article 1er du Décret n° 71.636 du 21 Juillet 1971, cuites ou précuites dont la consommation peut être différée et a lieu soit à l'intérieur de l'établissement dans lequel est situé la cuisine ou l'atelier de fabrication, soit à l'extérieur dudit établissement.

Dans le premier cas ne sont visés par ces dispositions que les plats cuisinés dont la consommation est susceptible d'être différée au moins jusqu'au lendemain du jour de leur préparation et de leur cuisson.

Sont exclus des prescriptions ci-dessous énumérées les produits appertisés ou stérilisés ainsi que les produits de charcuterie et les salaisons.

ARTICLE 2 :

Sous réserve des modalités particulières concernant la déclaration des établissements de surgélation, toute personne responsable d'un établissement dans lequel sont préparés des plats cuisinés à l'avance est tenue d'en faire la déclaration au Préfet (Direction des Services Vétérinaires) du département dans lequel est situé cet établissement.

Cette déclaration est établie, en double exemplaire, sur des imprimés conformes au modèle qui a été agréé par le Centre d'Enregistrement et de Révision des Formulaires Administratifs (C.E.R.F.A.) sous le numéro 504114 et est annexé au présent arrêté (1).

La déclaration doit être faite dans le mois qui suit l'ouverture de l'établissement.

Les établissements existants antérieurement à la date de publication du présent arrêté doivent être déclarés dans les six mois suivant cette publication.

Il est délivré un récépissé sans frais de cette déclaration qui devra être présenté à toute réquisition des agents de contrôle des Services Vétérinaires.

CHAPITRE I - Dispositions relatives à l'aménagement et à l'équipement en matériel de cuisine et ateliers de fabrication de plats cuisinés à l'avance et à l'hygiène du Personnel.

ARTICLE 3 :

Les locaux et annexes doivent être de dimensions suffisantes afin que les activités professionnelles puissent s'y exercer dans des conditions d'hygiène convenables. Les locaux et postes de travail doivent être disposés de façon à réaliser une progression continue des différentes opérations.

La hauteur sous plafond des locaux doit être au moins égale à deux mètres cinquante.

Les locaux doivent être construits, agencés et équipés de façon que leur température intérieure soit compatible avec la bonne conservation des produits visés à l'article 1er quelle que puisse être notamment la température extérieure.

#### ARTICLE 4 :

Les installations doivent être conçues de telle sorte que soient évitées les pollutions à l'intérieur des locaux et annexes, notamment celles provoquées par le vent, les afflux d'eau, les insectes et les rongeurs.

Les locaux et annexes ne doivent pas communiquer directement avec des vestiaires, cabinets d'aisance ou des salles d'eau.

Des locaux ou emplacements particuliers doivent être réservés pour :

- L'entreposage des emballages et conditionnements ;
- La réception et l'entreposage des matières premières ;
- La préparation et le traitement des produits avec éventuellement, un local ou emplacement particulier pour la congélation ou la surgélation ;
- Le conditionnement ou l'emballage des produits finis ;
- L'entreposage des produits finis ;
- Le dépôt momentané des récipients contenant des déchets.

#### ARTICLE 5 :

Le sol, les murs et les cloisons, jusqu'à une hauteur d'au moins un mètre soixante quinze, sont constitués ou revêtus de matériaux résistants aux chocs, imperméables, imputrescibles, faciles à laver, à nettoyer et à désinfecter. Si des éléments juxtaposés sont utilisés, ils doivent être jointoyés de manière à assurer l'étanchéité aux liquides.

Les raccordements des murs avec le sol doivent être aménagés en gorge arrondie.

La pente du sol est réglée de façon à diriger les eaux résiduaires ou de lavage vers un orifice d'évacuation, muni d'un grillage et d'un siphon avec raccordement à l'égoût public chaque fois qu'il existe.

Lorsque les locaux ne sont pas desservis par le réseau d'égoût public, les eaux usées sont collectées et évacuées de telle sorte qu'en aucun cas elles ne constituent un risque d'insalubrité pour les produits, ni pour l'environnement.

#### ARTICLE 6 :

Les locaux doivent être aménagés de telle sorte que l'aération et la ventilation à l'intérieur soient assurées en tant que de besoin, afin de permettre le captage et l'élimination rapide des odeurs, fumées, buées ou vapeurs.

Les locaux doivent être pourvus d'un éclairage suffisant, naturel ou artificiel ne modifiant pas les couleurs.

## ANNEXE II

### ARTICLE 7 -

Les locaux doivent être approvisionnés en eau potable chaude et froide sous pression. Les prises d'eau doivent être en nombre suffisant et convenablement disposées de telle sorte que soit convenablement assuré le nettoyage du sol, des murs et du matériel.

Les tuyauteries froides sont, si nécessaires calorifugées afin qu'elles ne puissent donner lieu à des condensations de vapeur à leur surface.

### ARTICLE 8 -

Les locaux ne doivent pas renfermer des tuyaux d'évacuation d'eaux usées ou pluviales ou aboutissant à des fosses d'aisance.

L'établissement doit comporter, pour le personnel, des installations sanitaires suffisantes comprenant lavabos, vestiaires et cabinets d'aisance avec chasses d'eau.

Des lave-mains commandés au pied doivent être installés à la sortie des W.C. et à proximité des postes de travail. Ils doivent être pourvus d'eau chaude et d'eau froide ainsi que des produits nécessaires au nettoyage et à la désinfection des mains. Ils doivent être munis d'essuie-mains à n'utiliser qu'une fois.

Les locaux où sont manipulées les denrées périssables sont également équipés de dispositifs pour le nettoyage des couteaux et du petit matériel.

### ARTICLE 9 -

Tous les établissements doivent disposer d'une ou plusieurs installations de froid dont la capacité doit permettre au minimum l'entreposage des produits entrant dans la composition des plats correspondant à la production journalière de l'établissement. Une capacité d'entreposage correspondant à la production journalière de l'établissement doit être prévue pour les produits finis. Le revêtement intérieur de ces installations doit être constitué ou revêtu de matériaux résistant aux chocs imperméables, imputrescibles, faciles à laver, à nettoyer et à désinfecter.

Les installations de froid doivent être réalisées de telle sorte que la température intérieure soit en tous points :

- inférieure ou au plus égale à  $- 18^{\circ}\text{C}$  si les produits entreposés sont congelés ou surgelés ;
- compris entre  $0^{\circ}\text{C}$  et  $+ 3^{\circ}\text{C}$  si les produits entreposés sont réfrigérés.

Ces installations frigorifiques doivent être munies de thermomètres et, en ce qui concerne les enceintes visées à l'article 28, d'un thermomètre enregistreur. Dans ce cas, les graphiques seront conservés pendant un mois au moins à la disposition des Services d'Inspection. Ces thermomètres doivent être installés et placés de façon apparente et leur partie thermosensible doit se trouver dans la partie du local la plus éloignée de la source de froid et à une hauteur correspondant à la hauteur maximum de chargement des denrées;

ARTICLE 10 :

Tous les matériaux susceptibles d'être en contact avec les produits visés à l'article 1er doivent satisfaire à la réglementation en vigueur concernant les matériaux au contact des aliments.

Les tables, surfaces de découpage, récipients, ustensiles et appareillage divers sont constitués ou revêtus d'un matériau imperméable, lisse, imputrescible résistant aux chocs, facile à nettoyer et à désinfecter. L'usage du bois n'est toléré que pour les billots utilisés exclusivement pour les sections de parties osseuses.

ARTICLE 11 :

Les appareils dégageant de la chaleur ou des buées doivent être conçus et installés de telle sorte que ces émanations puissent être évacuées rapidement sans constituer une source d'altération pour les denrées.

ARTICLE 12 : L

Les récipients ou emballages ou conditionnements utilisés pour l'expédition ou l'entreposage des produits visés à l'article 1er, doivent être conçus de telle sorte qu'ils assurent la préservation et la conservation des produits dans des conditions satisfaisantes. Au moment de leur utilisation, ils doivent être en parfait état de propreté.

CHAPITRE II : Dispositions relatives à l'utilisation et à l'entretien des cuisines et ateliers de fabrication de plats cuisinés à l'avance et de leur matériel.

ARTICLE 13 :

Les locaux et leurs annexes ne doivent en aucun cas servir à l'habitation ni être utilisés comme garages, vestiaires ou réfectoires.

Il est interdit d'y fumer.

Ils ne doivent pas contenir d'objets ou de produits susceptibles de transmettre aux denrées des propriétés nocives ou des caractères anormaux.

La présence des animaux et notamment des chiens est interdite.

La destruction des rongeurs des insectes et de tout autre vermine doit y être systématiquement réalisée.

ARTICLE 14 :

Le sol doit être nettoyé et lavé en tant que de besoin et en particulier à l'issue de chaque journée de travail ou au moment de la relève des équipes. Le balayage à sec est interdit. L'utilisation de la sciure sur des sols est interdite.

Les eaux de lavage ainsi que toute autre matière liquide ou solide ne doivent pas être déversées sur la voie publique.

## ANNEXE II

Les murs, les cloisons, les tuyauteries ainsi que les plafonds doivent être propres et entretenus de telle sorte qu'ils ne constituent pas une source de contamination pour les produits.

### ARTICLE 15 :

Tous les matériaux susceptibles d'être en contact avec les produits visés à l'article 1er doivent être maintenus en bon état de propreté.

Le matériel, les tables et les récipients doivent être après le travail quotidien, soigneusement nettoyés, désinfectés et rincés. Leurs éléments démontables en contact avec les denrées, couteaux et grilles notamment, doivent à la fin des opérations être séparés, nettoyés, désinfectés et mis à l'abri de toutes pollutions jusqu'à la prochaine utilisation. Le petit matériel, tel que les couteaux, doit être entreposé, en dehors du temps de travail, dans un lieu propre, à l'abri des souillures.

Les enceintes froides doivent être maintenues en constant état de propreté et désinfectées chaque fois que de besoin.

Les produits utilisés pour le nettoyage et la désinfection de ces matériaux doivent être conformes à la réglementation en vigueur.

Les insecticides, désinfectants, ou tout autre substance pouvant présenter une certaine toxicité sont entreposés dans des locaux ou armoires fermant à clé. Ils sont utilisés sans risquer de contaminer les produits.

### ARTICLE 16 :

Le personnel est tenu à la plus grande propreté corporelle et vestimentaire.

Il doit notamment porter des vêtements de travail et une coiffure propres, celle-ci enveloppant la totalité de la chevelure. Les mains sont lavées et désinfectées plusieurs fois au cours d'une même journée, notamment à chaque reprise du travail et après usage des cabinets d'aisance.

### CHAPITRE III - Dispositions relatives à la préparation et à l'utilisation des plats cuisinés à l'avance conservés par la chaleur.

### ARTICLE 17 :

Les denrées employées doivent avoir été reconnues propres à la consommation et ne présenter aucune trace d'altération même superficielle.

### ARTICLE 18 :

Les plats cuisinés à l'avance destinés à être conservés avant leur consommation par la chaleur doivent être dès la fin de la cuisson, mis dans des récipients qui seront aussitôt munis de leur couvercle.

ARTICLE 19 :

Depuis la fin de la cuisson jusqu'au moment de la remise au consommateur la température à coeur des plats cuisinés doit être constamment égale ou supérieure à + 65° C.

ARTICLE 20 :

Les plats cuisinés à l'avance conservés par la chaleur doivent être consommés le jour même de leur préparation et cuisson.

ARTICLE 21 :

Les récipients réutilisables destinés au transport des plats cuisinés doivent être avant leur remplissage, nettoyés, lavés, désinfectés par un procédé autorisé et rincés.

ARTICLE 22 :

Dès qu'ils sont vides, les récipients réutilisables doivent être nettoyés et lavés sur le lieu même où sont consommés les plats cuisinés ; leur transport est interdit si ces opérations n'ont été, au préalable, correctement effectuées.

CHAPITRE IV - Dispositions relatives à la préparation et à l'utilisation des plats cuisinés à l'avance conservés par un procédé de réfrigération, de congélation ou de surgélation.

ARTICLE 23 :

Les composants d'origine animale des plats cuisinés à l'avance conservés par un procédé de réfrigération, de congélation ou de surgélation doivent être conformes aux dispositions des articles 5 à 11 de l'arrêté du 26 Juin 1974 réglementant les conditions hygiéniques de congélation, de conservation et de décongélation des denrées animales et d'origine animale.

ARTICLE 24 :

Les plats cuisinés à l'avance destinés à être conservés avant leur consommation par un procédé de réfrigération, de congélation ou de surgélation, doivent être conditionnés, immédiatement après leur cuisson, en unités individuelles ou non, de telle manière que leurs dimensions ne fassent pas obstacle au respect des prescriptions énoncées à l'article 26 ci-dessous.

Tout transvasement est interdit, sauf dans un délai de deux heures précédant la mise en consommation.

ARTICLE 25 :

Les plats cuisinés à l'avance conditionnés doivent subir un refroidissement rapide dans une enceinte isolée conforme aux normes hygiéniques en vigueur.

ANNEXE II

ARTICLE 26 :

La durée du refroidissement entre la fin de la cuisson et l'obtention d'une température à coeur de + 10° C doit être inférieure ou égale à deux heures.

ARTICLE 27 :

Si le conditionnement est effectué dans des récipients réutilisables, ceux-ci doivent être utilisés conformément aux prescriptions des articles 21 et 22 ci-dessus.

ARTICLE 28 :

Dès la fin de la phase de refroidissement, les plats cuisinés à l'avance réfrigérés doivent être entreposés dans une enceinte froide assurant une température de conservation inférieure ou égale à + 3° C en tous points de la denrée.

ARTICLE 29 :

La durée de conservation des plats cuisinés à l'avance réfrigérés entre la fin de la cuisson et la consommation doit être inférieure ou égale à six jours.

Toutefois, cette durée pourra être prolongée par décision ministérielle.

ARTICLE 30 :

La mise en congélation des plats cuisinés à l'avance destinés à être congelés ou surgelés doit suivre immédiatement le refroidissement.

La température d'entreposage des plats cuisinés, congelés ou surgelés doit être inférieure ou égale à - 18° C.

ARTICLE 31 :

Sur l'une des faces externes de chaque conditionnement doivent figurer les inscriptions suivantes :

- Température d'entreposage obligatoire ;
- Marque de salubrité conforme aux dispositions de l'article 35 ci-dessous.

En outre :

- Pour les plats cuisinés à l'avance, congelés ou surgelés, la date inscrite en clair, de la congélation suivie pour les plats cuisinés congelés de la lettre C ou T conformément aux dispositions de l'article 13 de l'Arrêté du 26 Juin 1974 réglementant les conditions hygiéniques de congélation, de conservation et de décongélation des denrées animales ou d'origine animale.
- Pour les plats cuisinés, réfrigérés : la date, inscrite en clair, du jour de la cuisson, à consommer avant le .....



ARTICLE 32 :

Lorsque les plats cuisinés à l'avance, conservée par un procédé de réfrigération sont destinés à être consommés dans un établissement de restauration public ou privé, ils doivent être réchauffés par un procédé autorisé de telle manière que la température d'entreposage du plat soit élevée jusqu'à + 65° C à coeur en moins d'une heure et maintenus à cette température jusqu'au moment de leur utilisation.

Sauf dérogation pouvant être accordée par décision ministérielle, la décongélation des plats cuisinés à l'avance, congelés ou surgelés doit précéder immédiatement le réchauffement et être incluse dans le délai d'une heure prévu pour cette opération.

ARTICLE 33 :

La décongélation avant la vente des plats cuisinés congelés est interdite sauf dérogation pouvant être accordée par décision ministérielle.

CHAPITRE V - Conditions Sanitaires

ARTICLE 34 :

Sont reconnus propres à la consommation, les plats cuisinés à l'avance qui satisfont à des critères d'appréciation favorables du point de vue organoleptique et qui préparés, entreposés, transportés et distribués dans les conditions d'hygiène prescrites par le Décret n° 71.636 du 21 Juillet 1971 et les arrêtés pris pour son application répondent aux normes publiées en annexe du présent arrêté.

ARTICLE 35 :

Cette conformité est attestée :

- Pour les plats cuisinés à l'avance, conservés par un procédé thermique, par le remise de documents accompagnant les denrées durant leur transport sur lequel est reproduite la marque de salubrité : bon de livraison, facture ...
- pour les plats préparés à l'avance, conservés par un procédé frigorifique, par l'apposition sur chaque conditionnement de la marque de salubrité.

Le modèle de la marque de salubrité et les modalités concernant son attribution, son utilisation et son retrait figurent en annexe du présent règlement.

ARTICLE 36 :

Sont considérés comme impropres à la consommation :

- Les plats cuisinés à l'avance qui ne satisfont pas aux conditions et normes définies à l'article 34 ci-dessus.
- Les plats cuisinés à l'avance conservés par la chaleur et non consommés le jour même de leur cuisson.
- Les plats cuisinés à l'avance, réfrigérés et non consommés dans les cinq jours qui ont suivi le jour de leur fabrication.

ANNEXE II

- Les plats cuisinés à l'avance conservés par un procédé frigorifique et réchauffés, mais non consommés le jour même du réchauffement.

Avant leur retrait de la consommation, conformément aux dispositions de l'article 6 du Décret n° 71.636 du 21 Juillet 1971, ils sont entreposés dans un local ou une partie du local uniquement affecté à cet usage et fermant à clef.

ARTICLE 37 :

Les responsables d'établissements où sont préparés des plats cuisinés à l'avance doivent faire procéder à leurs frais à des contrôles microbiologiques périodiques. La périodicité de ces contrôles figure en annexe du présent arrêté.

Les résultats de ces examens sont mis à la disposition des Services Vétérinaires et conservés pendant un an au moins.

ARTICLE 38 :

Pour les établissements nouveaux, les dispositions de l'article 35 ci-dessus sont applicables à compter de la date de publication du présent arrêté.

Pour les établissements existants, ces dispositions sont applicables dans un délai de douze mois, à compter de la date de publication du présent arrêté.

ARTICLE 39 :

Le Directeur des Services Vétérinaires, le Chef du Service de la Répression des Fraudes et du Contrôle de la Qualité, le Directeur des Pêches Maritimes et le Directeur de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'application du présent arrêté, qui sera publié au Journal Officiel de la République Française.

FAIT A PARIS, le 26 Juin 1974

Le Ministre de l'Agriculture,  
Pour le Ministre,  
et par délégation,  
Le Directeur du Cabinet  
F. BLAIZOT

Le Secrétaire d'Etat aux  
Transports  
Pour le Secrétaire d'Etat  
et par délégation,  
Le Directeur du Cabinet,

Claude ABRAHAM

ANNEXESCRITERES MICROBIOLOGIQUES DES PLATS CUISINES A L'AVANCE

Pour qu'un plat cuisiné à l'avance puisse être reconnu propre à la consommation conformément à l'article 3 du Décret n° 71.636 du 21 Juillet 1971, il doit correspondre aux critères microbiologiques suivants :

## Germes pathogènes :

Salmonella .....	Absence dans 25 grammes de produit
Staphylocoques présumés pathogènes.....	Moins de 100 germes au gramme de produit -absence dans 1 cg de produit - (1)

## Germes témoins de contamination fécale :

Coliformes .....	Moins de 1000 germes au gramme de produit (moins de 100 germes dans 1 dg de produit) (1)
Escherichia Coli .....	Moins de 10 germes au gramme de produit (absence dans 1 dg de produit) (1)
Anaérobies sulfitoréducteurs (formes végétatives et spores) (incubation à 45° C).....	Moins de 30 germes au gramme de produit (moins de 3 germes dans 1 dg de produit) (1)

## Germes aérobies mésophiles (2)

(30-32° C, 72 H) .....	Au plus 300 000 germes au gramme de produit (au plus 150 germes dans 0,5 mg de produit) (1).
------------------------	--

(1) "Absence dans .." "moins de ..." "au plus..." signifient qu'en utilisant un inoculum de masse correspondante, on peut contrôler le critère. Toutefois, l'ensemencement simultané de masses inférieures et supérieures doit être conseillé en vue d'obtenir un meilleur renseignement concernant la contamination du produit et une expression plus complète des résultats.

(2) Ce critère n'est pas applicable aux produits dont la préparation comporte normalement une fermentation lactique.

## METHODES D'ANALYSES CONCERNANT LES PLATS CUISINES A L'AVANCE

### Méthode d'analyse courante

Les techniques générales sont celles qui ont été définies dans le recueil Hygiène des denrées d'origine animale. Techniques de laboratoire du Service Vétérinaire :

1. Les salmonelles sont recherchées selon les modalités ci-après :

Préenrichissement : Mettre 25 grammes de produit dans 100 ml d'eau peptonée tamponnée, incubé six heures à 37° C.

Enrichissement : Prélever 2 ml de la culture et les inoculer dans 20 ml de bouillon au tétrationate, Incuber vingt-quatre heures et quarante-huit heures à 43° C.

Isolement : Pratiquer un isolement sur gélose au vert brillant (il est souhaitable d'utiliser des milieux répartis en boîtes de Pétri de diamètre 140 mm).

2. Les staphylocoques présumés pathogènes sont dénombrés après vingt quatre heures d'incubation à 37° C en milieu Baird-Parker.
3. Les coliformes sont dénombrés sur gélose au désoxycholate après vingt quatre heures d'incubation à 30° C, ou sur bouillon lactosé bilié au vert brillant incubé à 30° C durant vingt quatre heures et quarante huit heures.
4. Les escherichia coli sont dénombrés sur gélose au désoxycholate après vingt quatre heures d'incubation à 44° C, ou sur bouillon lactosé bilié au vert brillant incubé à 30° C durant vingt quatre heures et quarante huit heures, suivi d'une confirmation par test de Mackenzie.
5. Les anaérobies sulfitoréducteurs sont dénombrés après vingt quatre heures et quarante huit heures d'incubation à 46° C sur gélose T.S.N. ou S.P.S.
6. La flore mésophile est recherchée sur gélose pour dénombrement après soixante douze heures d'incubation à 30° C.

### METHODES DE REFERENCE

Lorsque les résultats des examens pratiqués par les professionnels et par les Services de contrôle seront divergents pour un produit de même nature et de même provenance, les examens que ce litige rendrait nécessaires seront pratiqués selon les méthodes de référence AFNOR (norme expérimentale V.08.011 (Décembre 1973) "Microbiologie alimentaire Directives générales pour le dénombrement des germes aérobies mésophiles V.09 A-doc (Janvier 1974), projet de norme relatif au dénombrement des coliformes et escherichia coli et d'autres normes à paraître dans cette série) ou, à défaut de ces normes AFNOR, selon la méthode préconisée dans le recueil Hygiène des denrées animales et d'origine animale. Technique de laboratoire du Service Vétérinaire.

Lorsqu'il y aura lieu de vérifier si des "staphylocoques présumés pathogènes" sont réellement des "staphylocoques potentiellement dangereux" on retiendra comme critères de confirmation des colonies suspectes la mise en évidence soit d'une coagulase, soit d'une prophatase et d'une DNase conjointement.

## ANNEXE II

### PERIODICITE DU CONTROLE MICROBIOLOGIQUE QUE DOIVENT FAIRE EFFECTUER LES RESPONSABLES D'ETABLISSEMENTS OU SONT PREPARES DES PLATS CUISINES A L'AVANCE

-----

Les responsables d'établissements où sont préparés des plats cuisinés à l'avance doivent faire effectuer au moins le contrôle microbiologique d'un plat par semaine.

Ce contrôle comprend la recherche de tous les germes énumérés à l'annexe III.

L'échantillon prélevé est constitué :

- soit par une unité de vente maintenue dans son conditionnement ;
- soit s'il s'agit d'un conditionnement collectif, par une quantité équivalente à une portion individuelle.

### CONDITIONS D'ATTRIBUTION, D'UTILISATION ET DE RETRAIT DE LA MARQUE DE SALUBRITE

-----

#### MODELE DE LA MARQUE DE SALUBRITE

-----

#### I - ATTRIBUTION

Pour obtenir la marque de salubrité prévue à l'article 35 du présent arrêté, toute personne responsable d'un établissement dans lequel sont préparés des plats cuisinés à l'avance doit en avoir fait la demande au Directeur des Services Vétérinaires du Département où est implanté l'établissement.

La demande doit être renouvelée à chaque changement d'exploitant et lors de toute modification importante dans l'installation des locaux, leur aménagement, leur gros équipement ou leur affectation.

La marque de salubrité est attribuée après enquête des Services Vétérinaires aux fins de déterminer si les locaux, les installations et le matériel utilisé répondent aux conditions fixées par le présent arrêté.

#### II - UTILISATION

La marque de salubrité doit être reportée :

Sur l'une des faces externes de chaque conditionnement de plats cuisinés à l'avance conservés par des procédés de réfrigération, congélation ou surgélation ;

Sur le document accompagnant, durant leur transport, les plats cuisinés à l'avance conservés par la chaleur.

### III - RETRAIT

Indépendamment des sanctions prévues par les lois du 1er Août 1905, du 8 Juillet 1965 et les textes pris pour leur application, le non-respect des dispositions du présent arrêté pourra entraîner le retrait de la marque de salubrité.

### IV - MODELE

La marque de salubrité doit être de forme circulaire. Son diamètre est de 20 mm. Les mentions suivantes doivent figurer en caractères parfaitement lisibles :

- dans une couronne marginale, la mention Inspection Sanitaire Vétérinaire ;
- au centre, le numéro d'immatriculation de l'établissement dans lequel sont préparés les plats cuisinés à l'avance ;
- au dessous, du numéro d'immatriculation, les lettres P C désignant la nature de l'activité de l'établissement.

Critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale. Arrêté ministériel du 21 Décembre 1979 - J.O. du 19 Janvier 1980 - 784 NC.

Plats cuisinés à l'avance, escargots préparés, pièces de viandes cuites tranchées ou non.

• MICROORGANISMES - AEROBIES 30° C (par gramme)	300 000
• COLIFORMES 30° C (par gramme)	1 000
• COLIFORMES FECAUX (44° C) -par gramme-	10
• STAPHYLOCOCCUS - AUREUS (par gramme)	100
• ANAEROBIES SULFITO-REDUCTEURS 46° C (par gramme)	30
• SALMONELLA dans 25 grammes	absence



REPUBLIQUE FRANCAISE  
 MINISTERE DE L'AGRICULTURE  
 DIRECTION GENERALE DE L'ALIMENTATION

Service Vétérinaire d'Hygiène Alimentaire : Note de Service  
 Bureau : Produits Carnés : DGAL/SVHA/N88/N° 8106  
 Adresse : 175, rue du Chevaleret : du 31 mai 1988  
 75646 PARIS CEDEX 13 :  
 Téléphone : 45.84.13.13 Poste : 54.98 : Classement : PA 32525

13. JUIN 1988

ARRIVÉE

CB/JJB - N° 76

/// // // //-  
 de Service

Objet : Prolongation de la durée de vie des plats cuisinés à l'avance, modification du protocole permettant d'obtenir les autorisations.

Référence : Arrêté du 26 juin 1974, relatif aux conditions d'hygiène applicables dans les ateliers de préparation de plats cuisinés à l'avance.

L'arrêté du 26 juin 1974 définit dans son article premier les plats cuisinés à l'avance comme l'ensemble des préparations culinaires composées pour tout ou partie des denrées visées à l'article du ler du décret 71.636 du 21 décembre 1971 cuites ou précuites dont la consommation peut être différée.

Les produits appertisés ou stérilisés ainsi que les produits de charcuterie et les salaisons sont exclus du champs d'application de l'arrêté.

L'article 29 réglemente la durée de vie des plats cuisinés réfrigérés et précise que cette durée ne peut normalement pas excéder six jours ; elle peut toutefois être prolongée par décision ministérielle.

En effet, certains plats cuisinés à l'avance réfrigérés peuvent, du fait des conditions particulières de leur traitement, ou de la qualité des denrées mises en oeuvre, rester plus longtemps conformes aux critères microbiologiques prévus par l'Arrêté Ministériel du 21 décembre 1979 et conserver également pendant ce délai leurs qualités organoleptiques initiales.

La présente note de service a pour but de rappeler les dispositions existantes en matière de prolongation de la durée de vie des plats cuisinés réfrigérés et de mettre en place un protocole d'autorisation allégé lorsque les plats cuisinés sont préparés selon des technologies offrant le maximum de sécurité.

#### I - Rappel des dispositions existantes

Le protocole mis en place en 1977 pour s'assurer du maintien des caractéristiques microbiologiques et organoleptiques satisfaisantes au-delà des six jours accordés par la réglementation, et permettre la délivrance des autorisations de prolongation de la durée de vie est le suivant :

.../...

PLAN DE DIFFUSION :	:	
<u>Pour exécution :</u>	:	<u>Pour information :</u>
- D.S.V.	:	- Préfets
- Directeurs des Laboratoires	:	- Contrôleurs Généraux
des Services Vétérinaires	:	- D.R.A.F.
	:	- D.D.A.F.
	:	



### ANNEXE III

- La demande d'autorisation ne peut être formulée que par l'exploitant d'un atelier titulaire de la marque de salubrité prévue par l'arrêté du 26 juin 1974.

Cet exploitant précise, dans le courrier qu'il adresse, pour formuler sa demande, au Directeur Départemental des Services Vétérinaires la liste des produits pour lesquels il souhaite obtenir cette autorisation, leur mode de conditionnement, le poids de chaque unité, et la durée de vie demandée pour chacun d'eux.

Jusqu'en 1983 les contrôles nécessaires pour accorder les autorisations étaient tous réalisés par le C.N.E.R.P.A.C., à l'exception des raviolis et pizzas qui pouvaient être examinés au Laboratoire des Services Vétérinaires des Bouches du Rhône ; par la suite le nombre croissant de demandes a conduit à répartir ces examens bactériologiques et organoleptiques entre le C.N.E.R.P.A.C. et d'autres Laboratoires des Services Vétérinaires, qui les réalisent selon le protocole mis au point par le C.N.E.R.P.A.C.

La liste de ces laboratoires désignés est maintenant la suivante :

- 1 - C.N.E.R.P.A.C. - PARIS
- 2 - Laboratoire National des Services Vétérinaires de BOULOGNE (PAS de CALAIS)
- 3 - Laboratoire du Centre National de Formation des Techniciens des Services Vétérinaires de LYON CORBAS (RHONE)
- 4 - Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de l'AVEYRON
- 5 - Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires des BOUCHES DU RHONE
- 6 - Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de la CHARENTE MARITIME
- 7 - Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de la DROME
- 8 - Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires du FINISTERE
- 9 - Laboratoire Départemental des services Vétérinaires de la LOIRE ATLANTIQUE
- 10 - Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires du MORBIHAN
- 11 - Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de la VENDEE
- 12 - Laboratoire Départemental des Services Vétérinaires de la VIENNE

L'exploitant demandeur doit donc indiquer le laboratoire dans lequel il souhaite que soient effectués les contrôles.

Le Directeur Départemental des Services Vétérinaires, dans la mesure où il est favorable à cette demande, la transmet au Bureau des Produits Transformés du Service Vétérinaire d'Hygiène Alimentaire de la Direction Générale de l'Alimentation ; s'il ne peut donner un tel avis il doit en avertir l'intéressé en motivant son refus.

La demande, après examen au Bureau des Produits Transformés est adressée au Laboratoire désigné qui prend contact avec l'exploitant. Il lui indique par ailleurs le nombre d'échantillons qu'il doit faire parvenir, les modalités et le rythme de leur transmission ainsi que le coût de l'ensemble des analyses.

Ces échantillons font l'objet de tests microbiologiques et organoleptiques dont les résultats sont ensuite adressés par le laboratoire, avec son avis, au Bureau des Produits Transformés ; celui-ci étudie les conclusions du laboratoire, délivre ou refuse l'autorisation et notifie sa décision au Directeur des Services Vétérinaires du département où se trouve l'atelier, à charge pour ce dernier de la communiquer à l'intéressé en lui rappelant les règles auxquelles il devra se conformer en matière d'autocontrôles et d'étiquetage. Le numéro de la décision doit en effet être reporté sur le conditionnement de chacun des plats cuisinés qui en bénéficie, lorsqu'il est exposé à la vente.

## II - Mise en place de nouvelles dispositions

L'allègement du protocole existant est aujourd'hui possible. En effet les technologies ont beaucoup évolué ces dernières années avec en particulier l'apparition de nouveaux systèmes de conditionnement et des traitements physico-chimiques appliqués aux produits dans leur conditionnement final.

Les expériences en matière de contrôle montrent une meilleure maîtrise de la production des plats cuisinés à l'avance :

- . Qualité des matières premières,
- . Rigueur dans le choix et l'application des technologies,
- . Maîtrise des circuits et aménagements des locaux,
- . Progrès en hygiène.

Les applications de la microbiologie se sont largement développées et il est possible aujourd'hui de mesurer la salubrité des produits selon une double analyse de risques : risque pathogène et risque d'altération.

Le risque pathogène s'appréhende par l'étude des bactéries pathogènes et des bactéries test d'hygiène; il est lié à la présence résiduelle d'une flore pathogène non sporulée ou, en cas de rupture de froid, à la germination de spores subsistant dans le produit et dont les formes végétatives pourront ensuite proliférer.

Le risque d'altération se mesure par l'évolution au cours du temps des différentes bactéries d'altération de la flore mésophile et psychrotrophe.

La sécurité d'un produit sera conditionnée par l'hygiène qui présidera à sa préparation, le traitement thermique qui lui sera appliqué, les températures auxquelles il sera conservé et distribué.

### Plats cuisinés visés par l'allègement du protocole

Les produits pour lesquels cet allègement est possible sont les PLATS CUISINÉS A L'AVANCE REFRIGÉRÉS dont le traitement thermique, éventuellement précédé d'une précuisson, est effectué dans le conditionnement final de telle sorte qu'aucune contamination ne puisse intervenir ultérieurement sur le produit.

### Conditions préalables

Les règles auxquelles doivent répondre ces produits sont les suivantes :

- 1) - Production dans un atelier possédant la marque de salubrité.
- 2) - Contrôle régulier de la conformité des matières premières aux critères microbiologiques prévus par l'arrêté du 21 décembre 1979.
- 3) - Traitement thermique, réalisé en respectant un barème préétabli dont le fabricant s'est assuré de l'efficacité auprès d'un organisme ou d'une personne compétente.

### ANNEXE III

Le fabricant doit notamment avoir la certitude que les produits resteront après ce traitement, conformes aux critères microbiologiques prévus par l'arrêté ministériel du 21 décembre 1979 pour les plats cuisinés à l'avance, et ce jusqu'à 48 heures après la date limite de consommation lors d'une conservation permanente à + 3°C. Le fabricant doit, pour tenir compte d'aléas éventuels, effectuer une vérification complémentaire de conformité, à savoir :

. Pour les produits ayant une durée de vie de 21 jours : 14 jours à + 4°C, suivis de 7 jours à + 8°C.

. Pour les produits ayant une durée de vie de 42 jours : 28 jours à + 3°C, suivis de 14 jours à + 8°C.

4) - Contrôle du traitement à chaque cycle de cuisson refroidissement, effectué de l'une ou l'autre des façon suivantes.

a) - Contrôle de la température à coeur du produit (ti) à partir d'un échantillon sacrifié, par thermomètre sonde pourvu d'un dispositif d'enregistrement.

b) - Contrôle de la température de l'enceinte (te) par thermomètre enregistreur, cette température pouvant être rapportée, à la suite de l'étude préalable réalisée lors de l'établissement du barème, à celle à laquelle est alors portée la totalité du lot à coeur.

Dans un certain nombre de cas on exigera les deux prises de températures notamment dans ceux pour lesquels la connaissance de te est insuffisante pour déduire la valeur de ti.

Les graphiques résultant de ces enregistrements devront être conservés, à disposition des services de contrôle pendant une durée excédant d'un mois la durée de vie des produits fabriqués.

Le REFROIDISSEMENT RAPIDE, en cellule à froid cryogénique ou mécanique, ou dans un bain d'eau glacée sera conforme aux dispositions de l'arrêté du 26 juin 1974, il devra également faire l'objet d'un enregistrement.

5) - Vérifications de l'étanchéité des conditionnements effectuées régulièrement par l'exploitant qui consigne ces vérifications sur un registre présenté à toute réquisition des Services Vétérinaires.

6) - Autocontrôles régulièrement réalisés, au rythme d'au moins une fois par semaine sur chacun des produits après stockage à + 3°C jusqu'à la date limite de consommation et à + 8°C pendant un temps fonction de la durée de vie (voir ci-dessus). Dans chaque cas, les résultats doivent être conformes aux critères microbiologiques réglementaires.

7) - Indication, le cas échéant, sur l'étiquetage des différentes modalités de réchauffage. Ces modalités doivent permettre la remontée du produit à une température égale ou supérieure à 65°C en moins d'une heure.

#### Durée de vie des produits

Lorsque ces règles sont respectées la prolongation de la date limite de consommation est possible dans les conditions suivantes :

①) - Plats cuisinés portés à coeur à une température comprise entre 57°C et 65°C.

La prolongation de la durée de vie devra faire l'objet de la présentation d'un dossier technique qui sera transmis à un des laboratoires figurant page 2.

### ANNEXE III

(2) - Plats cuisinés portés à coeur à une température au moins égale à 65°C, avec application d'une valeur pasteurisatrice au moins égale à 100

( $vp_{70}^{10} = 100$ , germe de référence entérocoque (*Streptococcus faecalis*))

La détermination de la durée de vie du produit est placée sous la responsabilité du fabricant jusqu'à 21 jours.

(3) - Plats cuisinés portés à coeur à une température au moins égale à 70°C, avec application d'une valeur pasteurisatrice au moins égale à 1000

( $vp_{70}^{10} = 1000$ , germe de référence entérocoque (*Streptococcus faecalis*))

La date limite de consommation de ces préparations généralement appelés "plats pasteurisés" par le fabricant est placée sous la responsabilité de ce dernier.

S'agissant d'une date limite de consommation (et non d'une date limite d'utilisation optimale) elle ne devra pas être supérieure à 42 jours.

Le quantième du jour de cuisson devra figurer sur le conditionnement du produit.

#### Modalités d'autorisation

(1) - Dans le premier cas, vous me transmettez l'ensemble du dossier afin qu'il soit examiné par un laboratoire autorisé. Ce dossier comporte : la liste des produits préparés, les diagrammes de traitement des produits, la valeur pasteurisatrice atteinte et les résultats des contrôles bactériologiques.

(2) - Dans le deuxième cas l'exploitant doit vous adresser une demande précisant les produits préparés, la technologie et les valeurs pasteurisatrices appliquées, et la durée de vie demandée, il joindra à cette demande les résultats des contrôles bactériologiques effectués sur ces produits à la date limite de consommation.

Après inspection de l'établissement et vérification du fonctionnement et des indications fournies vous m'adresserez, dans le cas où votre avis est favorable, cette demande. Un numéro d'autorisation sera alors délivré à l'exploitant pour l'ensemble des préparations répondant aux caractéristiques précisées dans la demande.

N.B. - Pour ces deux premières catégories l'exploitant devra, au titre de l'auto-contrôle, adresser trois fois par an à l'un des laboratoires désignés indiqués plus haut, cinq échantillons d'un des plats pour lesquels il bénéficie d'une autorisation de prolongation de la durée de vie.

(3) - Dans le troisième cas le fabricant devra simplement vous déclarer son activité de production de plats "pasteurisés" en vous précisant les traitements thermiques appliqués à ces produits et les valeurs pasteurisatrices atteintes.

Après inspection de l'établissement, vérification du fonctionnement et des indications fournies vous m'adresserez dans le cas où votre avis est favorable, un courrier auquel sera jointe la déclaration du fabricant. Aucun numéro d'autorisation ne sera nécessaire pour ce type de production, mais une liste des établissements les fabriquant sera établie et mise à jour par le bureau des Produits Transformés.

### ANNEXE III

4) - Pour tous les autres cas les modalités d'autorisation se feront selon le protocole en place depuis 1977. Toutefois lorsque après obtention d'une autorisation l'exploitant met au point de nouveaux produits, selon la même technologie et en appliquant un traitement identique, la même autorisation lui sera accordée sans qu'un nouveau protocole d'analyses soit mis en place. Il suffira que vous m'indiquiez le nombre et l'appellation des nouveaux produits en me précisant que vous avez contrôlé que leur mode de préparation ne diffère pas de celui précédemment mis en place et que les analyses réalisées sur les produits en fin de date limite de consommation sont favorables.

Enfin, il importe de vérifier régulièrement que les règles mises en place au moment où l'autorisation a été accordée sont maintenues avec rigueur, des inspections inopinées réalisées au moins deux fois par an et à chaque nouvelle production annoncée devront être effectuées. A la suite de ces inspections vous m'indiquerez celles des autorisations qui doivent être retirées ou suspendues.

#### Marquage de salubrité

les conditionnements de tous les plats cuisinés à l'avance doivent être revêtus de la marque de salubrité attribuée à l'atelier de provenance dans les conditions prévues par l'arrêté Ministériel du 26 juin 1974.

Les entreprises bénéficiant d'un agrément communautaire pour leurs plats cuisinés à base de viandes et de viandes de volailles peuvent faire figurer de plus l'estampille communautaire telle que définie par l'article 29 de l'Arrêté du 3 mars 1981.

L'apposition de cette estampille ne les dispense pas de celle de la marque de salubrité "plats cuisinés à l'avance".

J'attire également votre attention sur le fait qu'il n'est pas possible de voir figurer une estampille communautaire sur les préparations à base d'autres denrées que les viandes de boucherie et de volailles.

Le Contrôleur Général  
Chef du Service Vétérinaire  
d'Hygiène Alimentaire

J. ADROIT

Notion de valeur pasteurisatrice

La pasteurisation désigne un traitement thermique qui détruit de manière plus ou moins poussée les espèces microbiennes sous leur forme végétative. Elle vise à éviter certains risques liés à la présence et à la prolifération de bactéries pathogènes non sporulées.

Appliquée seule, elle n'assure qu'une conservation très temporaire au produit traité.

Sous réserve que les produits ne soient pas recontaminés et que leur conservation se fasse à 3°C, leur durée de vie sera fonction de la valeur pasteurisatrice appliquée.

Pour établir ces valeurs pasteurisatrices un certain nombre de données sont nécessaires.

- A une température d'essai  $T_0$ , le temps D de réduction décimale nécessaire pour diviser par 10 le nombre de bactéries existant dans le milieu (destruction de 90 % de la population) est identifiée sous la forme  $D_{T_0}$ .

- La valeur D diminue si la température augmente ; dans les intervalles de température qui n'altèrent pas trop les propriétés nutritives et organoleptiques, il est possible de calculer les variations de D.

L'intervalle de température Z pour lequel les valeurs de D sont entre elles dans un rapport de 1 à 10 est, pour la plupart des bactéries, de 10°C (avec des variations de 6°C à 14°C).

Ainsi si pour détruire 90 % d'une population il faut 60 minutes à 60°C, il faudra 6 minutes pour obtenir le même résultat à 70°C.

- Le risque de survie d'un certain nombre de microorganismes dans le produit est d'autant plus faible que la population initiale est petite, ou que le nombre de divisions décimales est plus grand.

Le taux de destruction est le nombre de divisions décimales que l'on désire obtenir à la suite du traitement thermique.

Ainsi si l'on souhaite une réduction de population de  $10^4$  par gramme d'une denrée contenant  $10^{-2}$  bactéries par gramme. (1 germe par 100 grammes) Il faut appliquer 6 divisions décimales. Le taux de destruction est de 6.

Le temps nécessaire pour obtenir un taux de destruction n à la température  $T_0$  est la valeur pasteurisatrice partielle minimale à obtenir en fin de cuisson, il est exprimé par  $t = n D_{T_0}$ .

Par les relations entre  $D_{T_0}$  et Z, il est possible dans le cas où les températures à coeur d'un produit varient au cours de la cuisson, et du refroidissement, de calculer pour chaque température partielle intermédiaire, la valeur D correspondante et donc les valeurs pasteurisatrices partielles intermédiaires.

La somme des valeurs intermédiaires aboutit à la valeur pasteurisatrice totale désirée.

Choix d'un germe de référence

La notion de germe de référence est nouvelle en matière de plats cuisinés ; dans l'attente de notion plus précise sur la flore spécifique, la bactérie retenue sera celle classiquement choisie dans l'industrie de la semi-conserve, l'entérocoque (*Streptococcus faecalis*). Ce sont les valeurs D et Z de cette bactérie qui seront utilisées dans le calcul des valeurs pasteurisatrices recherchées.

Précisions relatives au choix des valeurs pasteurisatrices

La classification des plats cuisinés sous vide a été réalisée en tenant compte des observations suivantes :

1) - Une valeur pasteurisatrice théorique supérieure à 40 est totalement suffisante vis-à-vis de toutes les formes végétatives (flores pathogène et banale). Cependant, sa détermination nécessite :

a) Une prise de température fiable au point le plus froid de chaque lot fabriqué ; celle-ci est de détermination malaisée dans les conditions pratiques de fabrication en raison de la variabilité des températures à l'intérieur de l'enceinte chauffée.

Or, les variations de température ont des incidences importantes sur les calculs de valeurs pasteurisatrices ; les exemples ci-dessous en témoignent. Ces exemples supposent une estimation de la température à cœur à 2° C près.

<u>Températures</u>	<u>Temps</u>	<u>V.P.</u>
69° C <sup>+</sup> 2° C	50 mn	25 à 63
71° C <sup>+</sup> 2° C	50 mn	40 à 100
74° C <sup>+</sup> 2° C	40 mn	63 à 159
75,3° C <sup>+</sup> 2° C	295 mn	631 à 1584

b) Une déduction exacte de la valeur pasteurisatrice à partir de l'enregistrement thermique ; très peu de fabricants de plats cuisinés sont en mesure de faire le calcul.

2) Compte tenu de ce qui précède et de l'expérience acquise en la matière, il apparaît que des valeurs pasteurisatrices seuils tenant compte d'une marge de sécurité sont aujourd'hui nécessaires. Cependant, l'emploi d'une technologie et d'un matériel d'enregistrement de température assurant une précision satisfaisante peut permettre, après étude par le Service Vétérinaire d'Hygiène alimentaire, l'acceptation de valeurs inférieures à celles proposées de 100 et 1 000.

---

1.-Milieux de cultures utilisés

**B.E.A.**, bile-esculine-azide

Pastone	17 g
Peptone pepsique de viande	3 g
Extrait de levure	5 g
Bile de boeuf déshydratée	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Citrate de sodium	1 g
Esculine	1 g
Citrate de fer ammoniacal	0,50 g
Azide de sodium	0,25 g
Agar	13 g
Eau distillée	1000 ml

Ajuster le pH à 7,1. Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes.

**Chapman-mannité**

Peptone bactériologique	10 g
Extrait de viande de boeuf	1 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar	14 g
Eau distillée	1000 ml

Ajuster le pH à 7,4. Stérilisation à 120 °C pendant 15 minutes.

**PCA** (Plate Count Agar)

Peptone	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	1 g



Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Ajuster le pH à 7,0. Stérilisation à 121 °C pendant 15 minutes.

**C.I.N** (Cefsulodin-Irgrasan-Novobiocin)

Peptone spéciale	20 g	<u>Supplément</u>
Extrait de levure	2 g	
Manitol	20 g	Cefsulodin 7,5 mg.
Pyruvate de sodium	2 g	Irgrasan 2 mg
Chlorure de sodium	1 g	Novobiocine 12,5 mg
Sulfate de magnésium	0,01 g	
Désoxycholate de sodium	0,5 g	
Rouge neutre	0,03 g	
Cristal violet	0,001 g	
Agar	12,5 g	

Stériliser à 120°C pendant 15 minutes. Refroidir à 50°C et ajouter stérilement le contenu d'un flacon de supplément après l'avoir reconstitué avec 2 ml d'eau distillée et 1 ml d'éthanol. Mélanger doucement.

**Milieu tryptose gélosé**

Tryptose	20 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Glucose	1 g
Phosphate bipotassique	1 g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 ml

Ajuster le pH. Stérilisation à 105 °C pendant 25 minutes.

**Milieu bouillon nutritif**

Peptone	5 g
Extrait de viande	1 g
Extrait de levure	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml

Le pH final est ajusté. Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.

### Diluant tryptone sel

Tryptone	1 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée	1000 ml
Stérilisation à 120°C pendant 15 minutes.	

### 2.- Conditions d'ensemencement et d'incubation des échantillons de lieu noir pour l'analyse biologique initiale.

Flore ou bactérie recherchées	Milieu	Conditions d'incubation	Références
Flore aérobie mésophile totale	Plate Count Agar (PCA)	72 h à 30°C en aérobiose	APHA 1967
Flore aérobie psychrotrophe	(PCA)	10 jours à 8°C en aérobiose	APHA 1967
Entérobactéries	Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBG)	24 h à 30°C en aérobiose	MOSSEL et al. 1962
Coliformes	Vert Brillant (BLBVB)	24 à 48 h à 37°C en aérobiose	MACKENZIE et al. (1948)
Streptocoques fécaux	Gélose Bile, Esculine, Azide (BEA)	24 à 48 h à 37°C en aérobiose	ISEMBERG et al. 1970
Staphylocoques/ Microcoques	Gélose de Baird Parker (BP)	24 à 48 h à 37°C en aérobiose	BAIRD-PARKER 1962
Anaérobies sulfito-réducteurs	Gélose Sulfadiazine Polymyxine-Sulfite (SPS)	24 à 46°C en anaérobiose	ANGELOTTI et al. 1962

### 3.- Composition des milieux pour l'analyse électrophorétique

**Tableau n° 1 : Composition du tampon de lyse ou de solubilisation "UKS"  
(Zivy, 1986)**

SDS	1,25 %	0,625 g
Ampholines pre-blended	4 %	
pH 4 à 6,5	0,8 %	200 µl
pH 3,5 à 9	3,2 %	800 µl
Triton x 100	2 %	10ml d'une solution à 10 % (v/v)
Urée	9,5 mM	28,5 g
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5 mM	0,345 g
DTT	0,5 %	0,25 g
H <sub>2</sub> O		qsp 50 ml

**Tableau n° 2 : Composition des gels de première dimension**

Urée	10 g
acrylamide (30 %) + PDA (0,8 %)	2,5 ml
H <sub>2</sub> O ultrapure	6 ml
Triton x 100 10 % (m/v)	2 ml
ampholines	
pH 3,5 à 9,5	800 µl
pH 4 à 6,5	200 µl

**Tableau n° 3 : Composition des gels de deuxième dimension**

Acrylamide à 30 % + PDA à 0,8 %	15 %
H <sub>2</sub> O ultrapure	12,9 %
Tris 1,5 M pH 8,8	27 %
SDS à 10 %	1 %
Temed	0,05 %
APS à 10%	0,5 %

**Tableau n° 4 : Marqueurs protéiques utilisés pour les focalisations isoélectriques**

C-phycocyanine	pI 4,75 et 4,85
Azurine	pI 5,65
Myoglobine méthylée et trifluoroacetylée (Porc)	pI 5,92
Myoglobine méthylée (Porc)	pI 6,45
Myoglobine méthylée (Cheval)	pI 7,30

**Tableau n° 5 : Marqueurs protéiques utilisés pour les focalisations dénaturantes**

Phosphorylase b (muscle de lapin)	94,0 kDa
Albumine (sérum de boeuf)	67,0 kDa
Ovalbumine (blanc d'oeuf)	43,0 kDa
Anhydrase carbonique (érythrocyte de boeuf)	30,0 kDa
Inhibiteur trypsine (soja)	20,1 kDa
a-lactalbumine (lait de vache)	14,4 kDa

**Tableau n° 6 : Etapes de la révélation des protéines par coloration argentique, d'après Blum et al.,(1987)**

Etapes	Solutions	Durée du traitement
Fixation	50 % (v/v) éthanol 12 % (v/v) acide acétique 0,05 % (v/v) formaldéhyde à 37 % (p/v)	minimum 1 heure
Lavages	50 % (v/v) éthanol	3 x 20 minutes
Prétraitement	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 5H <sub>2</sub> O : 0,2 g/l	1 minute
Rinçages	H <sub>2</sub> O	3 x 20 minutes
Imprégnation	AgNO <sub>3</sub> : 1 g / l formaldéhyde à 37 % : 0,75 ml / l	20 minutes
Rinçages	H <sub>2</sub> O	2 x 20 secondes
Développement	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> : 60 g / l formaldéhyde à 37 % : 0,5 ml / l Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 5H <sub>2</sub> O : 45 mg/l	10 minutes
Lavages	H <sub>2</sub> O	2 x 2 minutes
Arrêt	50 % (v/v) éthanol 12 % (v/v) acide acétique	10 minutes
Lavage	50 % (v/v) éthanol	minimum 20 minutes

## ANNEXE V

### Tests statistiques

Courbes de TDT comparées		pente de la droite -a-	écart type de -a-	coefficient de Student -t-	degré de liberté -ddl-	résultats (S : différence significative pour le risque 5 %) (NS : différence significative pour le risque 5 %)
Bactéries	Milieus					
<i>Enterococcus faecium</i>	Tampon phosphate	-0,10408	0,013797	0,015	4	NS
	Fish	-0,10383	0,019930			
<i>Staphylococcus aureus</i>	Tampon phosphate	-0,09721	0,007453	7,53	6	S
	Fish	-0,16177	0,015417			
<i>Yersinia enterocolitica 1</i>	Tampon phosphate	-0,08623	0,017520	2,87	7	S
	Fish	-0,12426	0,021224			
<i>Yersinia enterocolitica 2</i>	Tampon phosphate	-0,14205	0,016220	0,27	6	NS
	Fish	-0,13593	0,036034			
<i>Micrococcus varians</i>	Tampon phosphate	-0,16552	0,027205	2,1	4	NS
	Fish	-0,21193	0,026908			
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	Tampon phosphate	-0,12375	0,005340	2,88	4	S
	Fish	-0,10375	0,010767			

Comparaison statistique des pentes des courbes de TDT par le test Student.



Figure n° VI.1 : Evolution des pH dans des échantillons de lieu noir contaminés par Enterococcus faecium, après un traitement thermique à 60°C pendant 20 minutes.

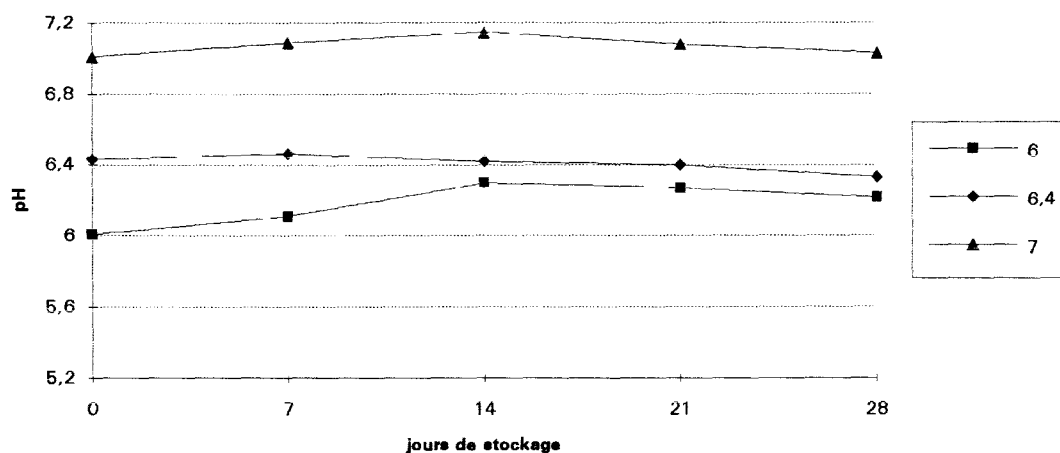


Figure n° VI.2 : Evolution des pH dans des échantillons de lieu noir contaminés par Staphylococcus aureus, après un traitement thermique à 60°C pendant 10 minutes.

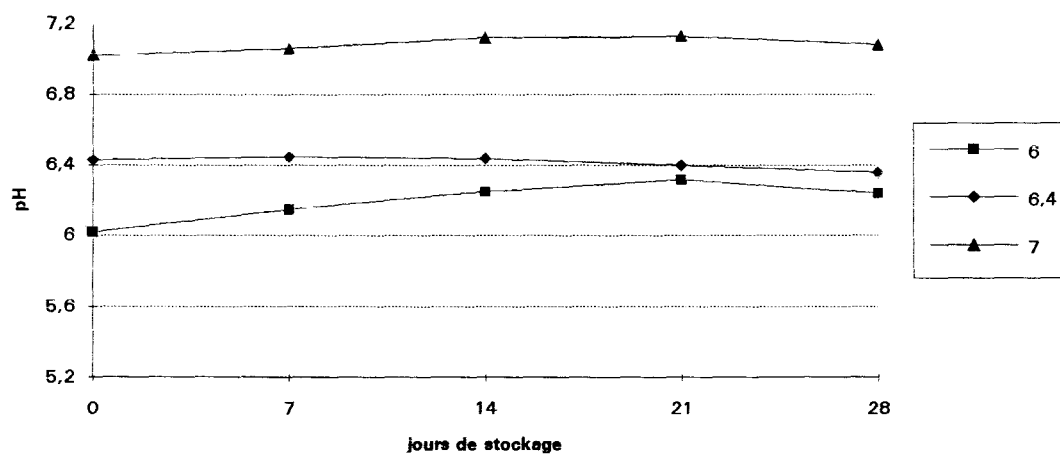


Figure n° VI.3 : Evolution des pH dans des échantillons de lieu noir contaminés par Yersinia enterocolitica 1, après un traitement thermique à 60°C pendant 14 minutes.

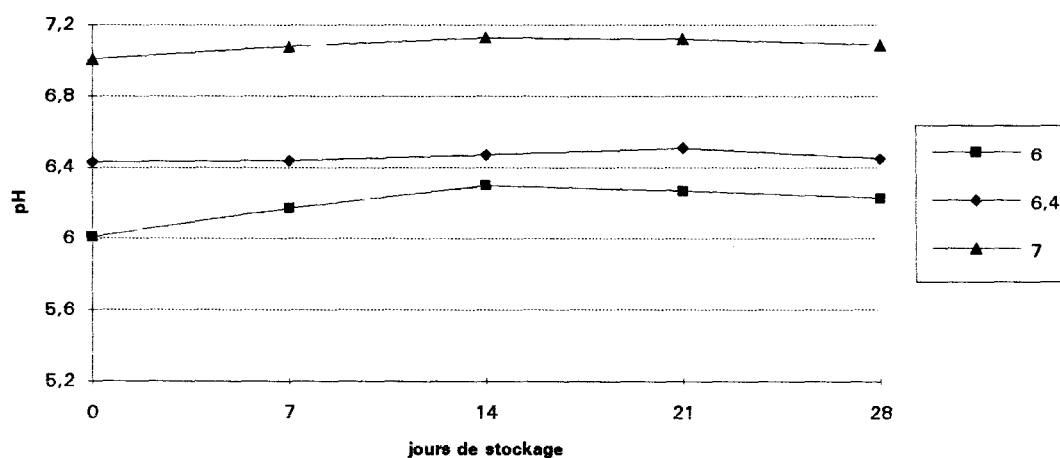




Figure n° VI.4 : Evolution des pH dans des échantillons de lieu noir contaminés par *Yersinia enterocolitica* 2, après un traitement thermique à 60°C pendant 14 minutes.

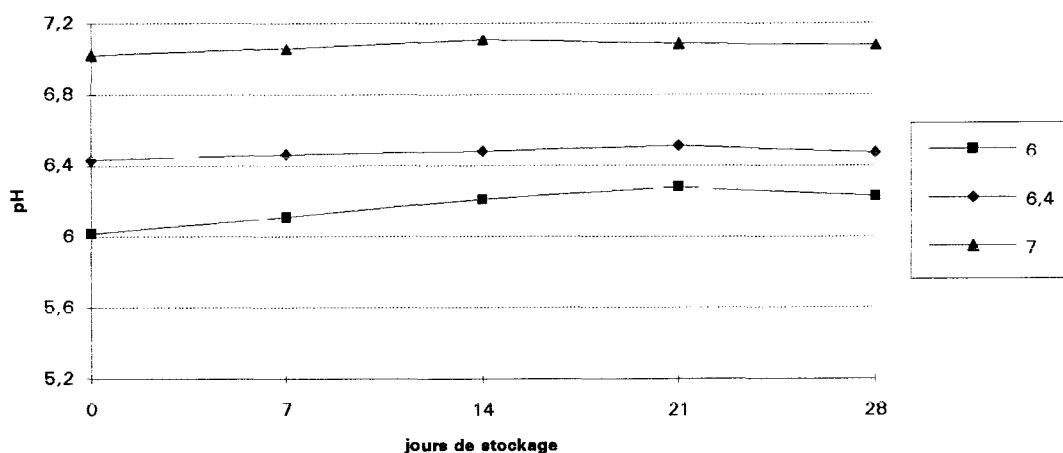


Figure n° VI.5 : Evolution des pH dans des échantillons de lieu noir contaminés par *Micrococcus varians*, après un traitement thermique à 60°C pendant 17 minutes.

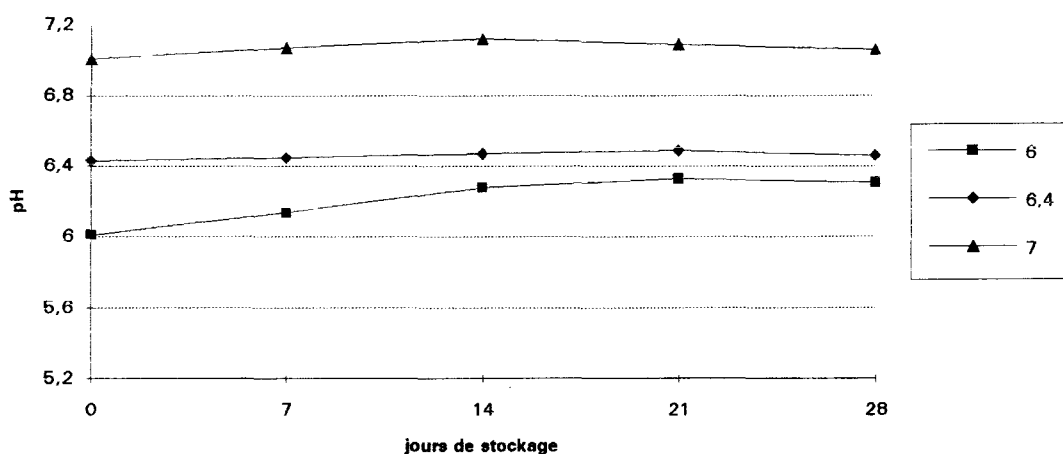


Figure n° VI.6 : Evolution des pH dans des échantillons de lieu noir contaminés par *Pseudomonas paucimobilis*, après un traitement thermique à 60°C pendant 20 minutes.

