
Effet des ultra-violetes sur les microorganismes de contamination de la tomate

Amandine Cottaz, Nadia Oulahal & Issam Sebti

*IUTA – Université Claude Bernard Lyon 1
Laboratoire de Recherche en Génie Industriel Alimentaire
Site Alimentec, rue Henri de Boissieu, 01 060 Bourg-en-Bresse Cedex 9*

*cottaz@iutbourg.univ-lyon1.fr ; oulahal@iutbourg.univ-lyon1.fr ;
sebti@iutbourg.univ-lyon1.fr*

**Section de rattachement : 64
Secteur : Secondaire**

*RÉSUMÉ. Dans un contexte global de sécurité alimentaire, associé à une recherche de nouveaux procédés d'amélioration de la qualité, de prolongement de la fraîcheur, mais aussi de volonté de diminution des pertes post-récoltes, le présent projet a pour but de combiner les effets antimicrobiens des ultravioletes (UV) et de l'ozone pour décontaminer les fruits et légumes. L'étude présentée ici s'attarde tout particulièrement à la phase 1 de l'étude des effets des UV sur (i) des souches pures habituellement retrouvées dans les cas d'altération de la tomate, (ii) des flores de contamination de terrain et (iii) les flores directement traitées sur le fruit entier. Des bactéries Gram – (*Escherichia coli*), Gram + (*Staphylococcus aureus*) ainsi que des spores de moisissures (*Aspergillus niger*) ont été soumises à trois temps de traitement (5, 15 et 45 s) et trois distances de la lampe UV (0,5, 1 et 2 cm). Les spores d'*A. niger* ont présenté une résistance accrue aux UVC. Contrairement aux flores en mode planctonique décrochées des tomates qui répondent bien au traitement physique, l'effet des UV directement sur la tomate entière semble être limité.*

MOTS-CLÉS : UVC, tomate, Aspergillus niger, Staphylococcus aureus, Escherichia coli.

1. Introduction

Dans un contexte global de sécurité alimentaire, avec une recherche incessante de nouveaux moyens athermiques de lutte contre le développement de microorganismes indésirables, cette étude rentre dans le cadre d'un projet européen qui a pour but de combiner les effets antimicrobiens des ultraviolets (UV) et de l'ozone pour décontaminer les fruits et légumes, diminuer les pertes post-récoltes et prolonger ainsi leur durée de conservation. L'état de l'art montre un nombre important d'études sur l'activité antimicrobienne de l'UV seul ou de l'ozone seul. Très peu d'études traitent de l'action combinée et synergique des deux et aucune, à notre connaissance, n'a traité de l'effet de ce procédé sur les fruits et légumes. Les résultats présentés dans cet article s'attacheront tout d'abord à étudier l'effet de l'UV seul.

La majorité des études utilisant l'UV porte sur le traitement des eaux usées ou sur l'aseptisation de l'eau potable en substitution du chlore. L'efficacité est maximale entre 250 et 280 nm pour dénaturer l'ADN ou encore entraîner des modifications structurales membranaires induisant des pertes en composés cellulaires vitaux, ce qui conduit à la mort cellulaire (Liu *et al*, 1993 ; Nigro *et al*, 1998).

Parmi les fruits et légumes difficiles à conserver, l'étude a porté sur la tomate. Seuls les microorganismes d'altération et pathogènes suivants ont été examinés : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Aspergillus niger* (sous forme de spores). Préalablement à l'étude, un isolement et une identification partielle ont été réalisés à partir de prélèvements effectués en surface des tomates.

Les essais ont été conduits en mesurant l'effet antimicrobien de l'UV en fonction de la nature du microorganisme testé et de son mode de développement (planctonique ou biofilm), ceci à 3 distances de traitement des UV (0,5, 1 et 2 cm) et pendant 3 temps de traitement (5, 15 et 45s). La suite des essais s'est intéressée à l'effet des UVC sur la flore réelle des tomates après décrochage de celles-ci, puis sur le traitement direct des tomates. L'effet des UVC a été suivi par dénombrement.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Dispositif UV

L'appareil de laboratoire est muni d'une lampe UV et d'un filtre pour disposer des UVC à 254 nm. Ce dispositif permet de traiter des échantillons à distance et temps contrôlés (figure 1).

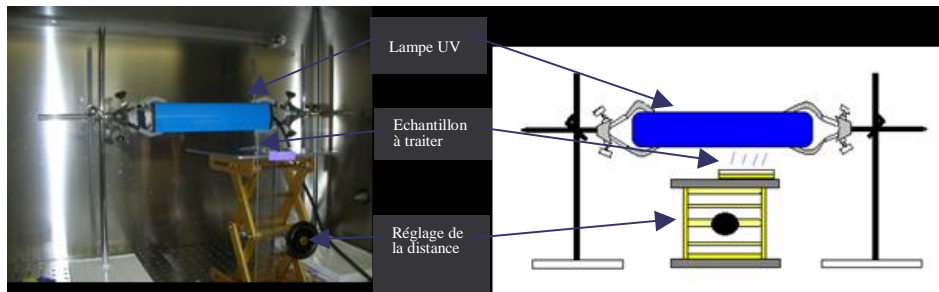


Figure 1 . Dispositif de traitement UV

2.1.2. Microorganismes et conditions de culture

- *Escherichia coli* LRGIA-EC1 est cultivé sur Bouillon Nutritif (Merck) à 37°C pendant 18h. En fin de période d'incubation, la concentration obtenue en bactéries est comprise entre 6.4×10^6 et 1.3×10^7 UFC.mL⁻¹ (Unité Formant Colonie par millilitre).
- *Staphylococcus aureus* CNRZ3 est cultivé de la même façon. La concentration obtenue en fin de période est comprise entre 4.7×10^5 et 5.3×10^6 UFC.mL⁻¹.
- *Aspergillus niger* ATCC 16404-CT est cultivé à température ambiante sur gélose Sabouraud (Merck). Les spores obtenues après 5 jours de culture sur Sabouraud sont récupérées par versement de 9 ml d'eau physiologique stérile contenant 0,1 % de Tween 80 (Sigma, St Quentin Fallavier) sur la surface de la gélose et raclage doux à l'aide d'un râteau stérile. Les spores sont transférées dans un tube stérile. La densité des spores est évaluée avec un hématimètre (Malassez) et un microscope optique (Zeiss, grossissement x40). La charge est comprise entre 1.1×10^7 et 3.7×10^7 spores.mL⁻¹.

2.2. Méthodes

Des essais préliminaires ont permis de fixer la charge microbienne des tests à 10^4 microorganismes ou spores/mL.

Après traitement, les échantillons sont ensemencés en surface sur le milieu préconisé à chaque microorganisme : Plate Count Agar dit PCA (Merck) pour la Flore Aérobie Mésophile (FAM) et incubés à 37°C, ceci pendant 24 à 48 h. Pour les levures moisissures, l'ensemencement est réalisé sur Sabouraud et incubé à 30°C au même temps de culture que précédemment.

Tous les essais ont été réalisés sur des microorganismes dans un même état physiologique. Ceci a été rendu possible en réalisant un volume de culture assez conséquent pour chaque souche avant l'ensemble des essais, et en aliquotant ces cultures en tubes mis en congélation ensuite à -20°C. Ces tubes, remis en culture

toujours de façon identique, ont donc permis de travailler sur des populations jugées identiques et comparables.

La mortalité cellulaire a été évaluée par la méthode des dilutions/étalements qui permet de quantifier l'aptitude des bactéries à se revivifier sur milieu gélosé.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition calculé comme suit :

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{UFC témoin} - \text{UFC test}}{\text{UFC témoin}} \times 100$$

Le témoin correspond aux échantillons non-traités et le test à ceux soumis aux UV.

2.2.1. Application des UV sur les microorganismes en suspension : mode planctonique

Les microorganismes traités sont en suspension dans une solution de tryptone sel. Un volume de 28 mL de chaque suspension de souche est placé dans une boîte de Pétri. Les échantillons sont traités aux différents couples distances et temps. Du papier aluminium est placé sous les boîtes pour accentuer l'effet réfléchissant du rayonnement UV. Ensuite, les étalements sur boîte et incubation sont opérés.

2.2.2. Application des UV sur les microorganismes en état biofilm

En mode biofilm, les cellules bactériennes adhèrent à un milieu gélosé (PCA) de façon à mieux simuler les microorganismes fixés à la surface des végétaux. Les boîtes de Pétri contenant le milieu approprié sontensemencées avec la quantité nécessaire pour obtenir 50 UFC/boîtes. Elles sont laissées 15 minutes, temps optimal d'adhésion. Ensuite les échantillons sont traités aux UV pendant 45 secondes à une distance de 2 cm.

2.2.3. Application des UV sur la tomate

2.2.3.1. Sur les flores prélevées sur la tomate et maintenues en suspension (mode planctonique)

La flore est décrochée par brossage de 10 tomates avec une brosse à dent stérile. 4 allers-retours horizontaux et verticaux sur chaque face sont réalisés avant rinçage avec 10 mL de solution de tryptone sel pour chaque tomate. 100 mL sont ainsi obtenus à la fin des essais. La solution est traitée comme les souches pures en mode planctonique. La FAM et les levures moisissures sont dénombrées sur PCA et Sabouraud.

2.2.3.2. Sur les flores présentes directement sur la tomate

Dans une deuxième série de test, les tomates sont traitées sous UV sous rotation continue à 2 cm de la lampe pendant 45 secondes. Puis, les microorganismes sont décrochés comme précédemment et étalés sur boîte pour incubation.

3. Résultats - Interprétation

La caractérisation physique de la lampe UV utilisée pour les essais a démontré que la lampe délivre du 254 et du 360 nm. Des essais préliminaires n'ont montré aucun effet biologique du pic à 360 nm dans les conditions expérimentales utilisées. Ensuite, un photo-détecteur calibré a été utilisé pour enregistrer la puissance UV émise en fonction de la distance à la lampe UV. La puissance UV diminue avec la distance de traitement en perdant presque 40 % entre 0,5 et 2 cm. Lors de ces essais, la puissance UV émise a été mesurée dans des conditions d'utilisation de matériaux réfléchissant ou non. Un support noir a été utilisé comme témoin et du papier aluminium simulant de l'acier inoxydable d'usage courant en industrie agroalimentaire a été choisi pour l'essai. Le papier aluminium permet d'augmenter la puissance UV récupérée d'un facteur compris entre 2,9 et 5,8.

3.1. Test des microorganismes en mode planctonique

3.1.1. Effet de l'UV sur *E. coli*

E. coli est un germe souvent associé à la qualité hygiénique des eaux de lavage et est retrouvé comme un indicateur de contamination fécale. La sensibilité de cette souche aux UV est présentée dans la figure 2.

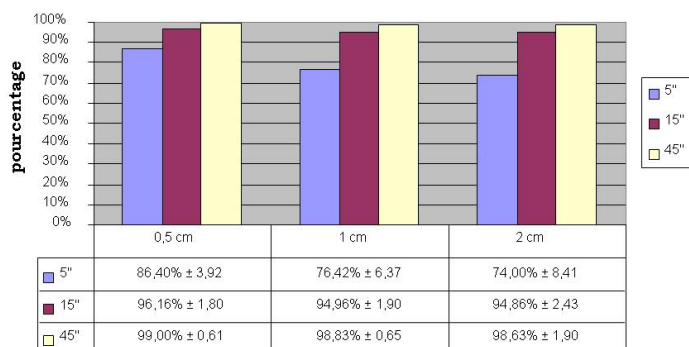


Figure 2 . Pourcentage d'inhibition pour *E. Coli* LRGIA EC01 après traitement UV

La souche d'*E. coli* testée est sensible aux UV (de 74 à 99 % d'inhibition). Cette inhibition est croissante avec le temps d'application. Il y a une différence significative ($P < 0,05$) entre 5s et 15s-45s et par contre aucun effet de la distance de traitement.

3.1.2. Effet de l'UV sur *S. aureus*

S. aureus, staphylocoque à coagulase positive est un germe pathogène. La sensibilité de cette souche aux UV est présentée dans la figure 3.

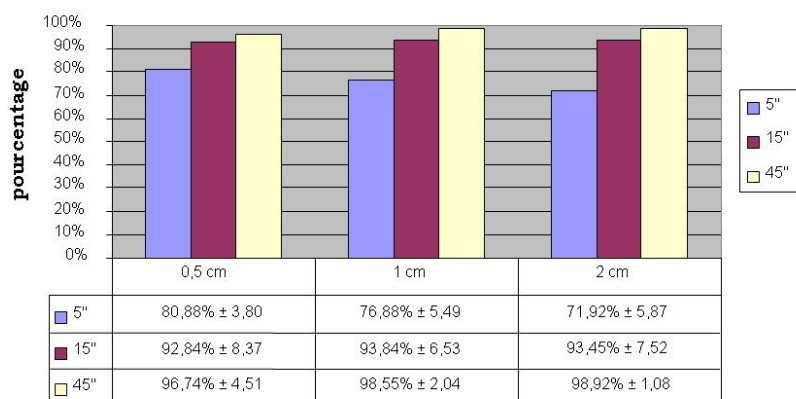


Figure 3 . Pourcentage d'inhibition sur *S. aureus* CNRZ3 après traitement UV

De même qu'*E. coli*, *S. aureus* est sensible aux UV et il y a une différence significative ($P < 0,05$) entre 5s et 15s-45s et pas d'effet de la distance de traitement.

3.1.3. Effet de l'UV sur les spores d'*A. niger*

La moisissure *A. niger* est très souvent associée aux problèmes de pourrissement des végétaux. Sa forme spore favorise la contamination et la dissémination. Seule la sensibilité aux UV de cette souche sous forme de spore est testée ici et présentée dans la figure 4.

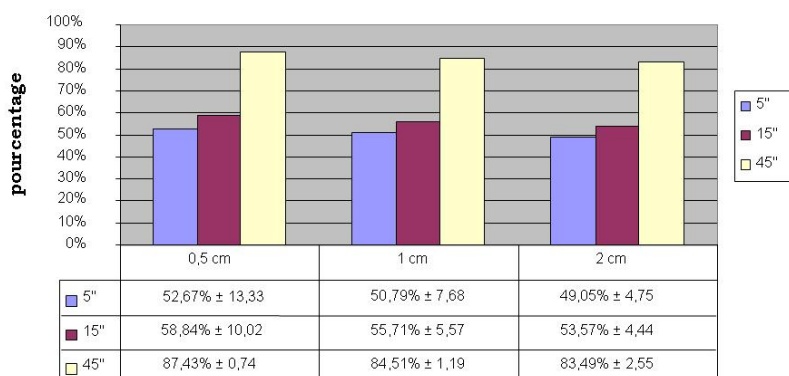


Figure 4 . Pourcentage d'inhibition d'*Aspergillus niger* ATCC 16404- CT après traitement UV

Ce qui ressort dans un premier temps, c'est la très forte résistance des spores aux UV comparée à celle des cellules végétatives bactériennes. Cependant, on note une

différence significative ($P < 0,05$) entre les trois temps d'application des UV, mais pas d'effet de la distance de traitement.

3.2. Test des microorganismes en état biofilm

Les résultats obtenus sont résumés dans la figure 5

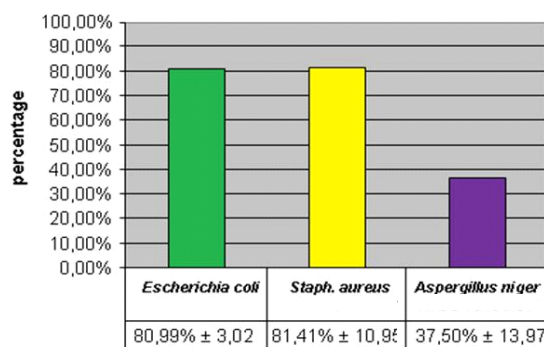


Figure 5 . Pourcentage d'inhibition des différents microorganismes soumis aux UV pendant 45 secondes à 2 cm.

La sensibilité des souches bactériennes aux UV ($P > 0,05$) est identique. Les spores de moisissures démontrent à nouveau une résistance aux UV supérieure aux bactéries.

En conclusion intermédiaire, dans le cas du mode planctonique, pour le temps le plus court (5 secondes), *Escherichia coli* a le pourcentage d'inhibition le plus élevé. D'après la littérature, les UV sont plus efficaces sur les bactéries Gram- (Hassen *et al.*, 2000).

Les spores d'*Aspergillus niger* ont démontré une forte résistance aux UVC. Marquis *et al.* (2006) confirme la résistance des formes sporulées par rapport aux formes végétatives.

Enfin, dans la limite de 2 cm, il n'y a pas ou peu de différence en fonction des distances de traitement à la lampe UV.

Dans le cas du mode biofilm, il y a une bonne inhibition à 5 secondes, sauf pour les spores d'*Aspergillus niger* qui présentent toujours une haute résistance aux UVC.

3.3. Test sur la tomate

Les pourcentages d'inhibition de la flore réelle de la tomate par traitement UVC après ou avant décrochage, sont présentés dans le tableau 1.

	Charge initiale	Inhibition (%)	
		Mode planctonique	Directement sur la tomate
FAM	2,5x10 ³ UFC.cm ⁻²	99,5 ± 0,3	0
Levures et moisissures	1,2x10 ³ UFC.cm ⁻²	99,5 ± 0,6	0

Tableau 1 . *Inhibition de la flore des tomates après traitement UV*

La flore d'altération des tomates après décrochage présente une forte sensibilité aux rayonnements UV. A l'inverse, les résultats obtenus par traitement direct sur la tomate ne montrent aucune inhibition des flores présentes à la surface des tomates pour le protocole de traitement UV appliqué.

4. Conclusion

Les différents résultats confirment la sensibilité des différentes souches testées aux rayonnements UVC. Les UVC sont responsables de l'action bactéricide. La suite des essais va s'attacher tout d'abord à optimiser la méthode de traitement direct des tomates, avant de tester l'ozone puis de combiner les deux traitements tout en suivant leurs effets sur la conservation des fruits et légumes.

Remerciements. Ce travail a le soutien de l'Europe dans le cadre des programmes transfrontaliers France-Suisse Interreg III 2006-2008. Ce programme implique Alimentec, Ereo et HEV'S. Ce travail a été réalisé avec l'aide de Sussana Pirondi et Anaïs Jeannin dans le cadre de leurs stages de fin d'études respectifs.

Bibliographie

- Hassen A., Mahrouk M., Ouzari H., Cherif M., Boudabous A., Damelincourt J.-J., « UV disinfection of treated wastewater in a large scale pilot plant and inactivation of selected bacteria in a laboratory UV device », *Bioresource Technology*, vol. 74, 2000, p. 141-150.
- Liu W.-K., Tebbs S. E., Byrne P. O. et Elliott T. S. J., « The effects of electric current on bacteria colonising intravenous catheters », *Journal of infection*, vol. 27, n° 3, 1993, p. 261-269.
- Marquis O., Miaud C. 2006. « Variation of UV sensitivity among frog populations along an altitudinal gradient », *Arctic, Antarctic and Alpine Research*. *Sous presse*
- Nigro F., Ippolito A., Lima G., « Use of UV-C light to reduce Botrytis storage rot of table grapes », *Postharvest Biology and Technology*, vol. 13, n° 3, 1998, p.171-181.