

# QUELLES APPLICATIONS INDUSTRIELLES POUR LA MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE

ELLOUZE M

IFIP, 7, Avenue du Général de Gaulle 94704 Maisons-Alfort.

## Présentation et historique

La microbiologie prévisionnelle est un outil qui permet de prévoir par des modèles mathématiques l'impact de différentes conditions environnementales de température, de pH, d'activité de l'eau (Augustin et al. 2005; Membre et al. 2005), de concentration en acides organiques et en inhibiteurs (Coll Cardenas et al. 2008) et de leurs interactions éventuelles (Augustin et al. 2005) sur la croissance, l'inactivation ou la survie des micro-organismes (Buchanan and Whiting 1996; McMeekin et al. 1993). Des modèles spécifiques ont ainsi été développés pour prévoir d'une part la croissance microbienne, et d'autre part la décroissance ou l'inactivation et ce pour les germes pathogènes (Shimoni and Labuza 2000) ou pour les germes d'altération (Koutsoumanis 2009). Historiquement, ce sont les modèles d'inactivation thermique qui ont été utilisés en premier notamment pour caractériser les barèmes de stérilisation et de pasteurisation. La microbiologie prévisionnelle de croissance s'est ensuite rapidement imposée pour prévoir l'évolution des micro-organismes depuis la fourche jusqu'à la fourchette en intégrant les différentes sources de variabilité et d'incertitude liées à la matière première, aux micro-organismes (Membre et al. 2005), aux différentes opérations unitaires du processus de fabrication, au mode d'emballage et aux divers scénarii thermiques rencontrés par l'aliment jusqu'à l'assiette du consommateur.

Pour cela, la microbiologie prévisionnelle se base sur deux familles de modèles. La première famille est celle des **modèles primaires** qui permettent de simuler le comportement des micro-organismes en fonction du temps et permettent de décrire la courbe de croissance microbienne avec ses quatre paramètres : la contamination initiale  $N_0$ , le temps de latence  $lag$ , le taux de croissance maximal  $\mu_{max}$  et la densité de population maximale  $N_{max}$  (Ross and McMeekin 2003). Les modèles primaires les plus utilisés à ce jour sont le modèle de Baranyi (Baranyi and Roberts 1994) et le modèle logistique avec délai et rupture proposé par Rosso (Rosso et al. 1995).

La seconde famille est celle des **modèles secondaires** qui permettent de simuler l'évolution des paramètres du modèle primaire ( $lag$ ,  $\mu_{max}$  ou  $N_{max}$ ) en fonction des conditions environnementales abiotiques telles que la température, le pH, l' $a_w$ , ou biotiques comme la compétition entre différentes espèces microbiennes (Drosinos et al. 2006) ou encore l'état physiologique de l'inoculum. On distingue généralement deux approches. **L'approche polynomiale** permet de décrire simultanément l'effet des facteurs étudiés et a été très utilisée dans les années 90 (Buchanan and Philips 2000; Carrasco et al. 2007; Giovannini et al. 2004; Seman et al. 2002). Cependant, elle présente de nombreux inconvénients : le nombre élevé de paramètres et l'absence de signification biologique, l'impossibilité d'extrapoler les résultats en dehors de la plage expérimentale, l'impossibilité de prendre en compte la variabilité intra-espèce sur la croissance et la nécessité de mettre en place des plans expérimentaux complexes et parfois contraignants. Par opposition à l'approche polynomiale, **l'approche progressive**, consiste à étudier et à modéliser séparément l'impact de chaque facteur environnemental puis à construire à partir de ces modules simples, un modèle général complet incluant l'effet de tous les facteurs. Cette approche d'abord proposée par Zwietering et appelée gamma concept (Zwietering et al. 1992) présente de nombreux avantages : les modèles sont plus robustes, ils impliquent un nombre de paramètres relativement faible, et ces paramètres ont le plus souvent une signification biologique (Delignette-Muller et al. 1995).

Différents logiciels sont aujourd'hui disponibles pour accéder à des applications de microbiologie prévisionnelle. Sym'Previs est le logiciel français développé en collaboration entre des centres techniques de l'agroalimentaire, des écoles ou instituts de recherche publics et privés, des industriels, ainsi que le Ministère chargé de la Recherche et le Ministère de l'Agriculture. Il propose une base de données qui décrit l'évolution des micro-organismes dans différentes matrices alimentaires, et également des modules de calcul pour établir pour des conditions données (de température, de pH, d' $a_w$ ...) l'évolution du micro-organisme d'intérêt dans la matrice choisie. Il existe également d'autres logiciels comme ComBase qui permet de réaliser des ajustements de modèles primaires ainsi que des simulations en utilisant des modèles polynomiaux. Néanmoins, la base de données ComBase reste assez hétérogène avec des données obtenues majoritairement en milieu de culture. Il existe également des logiciels qui ont été développés spécifiquement pour certaines catégories d'aliments comme le *Seafood spoilage and safety predictor* fourni par l'Institut Danois de Recherche sur les produits de la pêche et le *Refrigeration index* fourni par une équipe de recherche australienne et utilisé lors de l'exportation de viande Australienne.

## Applications de la microbiologie prévisionnelle

L'utilisation de la microbiologie prévisionnelle s'est généralisée pour plusieurs aliments tels que les charcuteries (Drosinos et al. 2006), les poissons (Koutsoumanis 2001; Ross et al. 2000), la volaille (Dominguez and Schaffner 2007), la viande de porc (Liu et al. 2006) et les applications industrielles sont aujourd'hui nombreuses.

La microbiologie prévisionnelle peut être utilisée par exemple pour déterminer et valider les durées de vie microbiologiques en se basant sur des simulations de l'évolution des micro-organismes limitants dans l'aliment étudié (Dalgaard 1995). Elle permet également d'optimiser la formulation des recettes au regard des dangers bactériens et d'adapter le processus de fabrication pour un aliment donné tout en réduisant le nombre des essais nécessaires à l'obtention du produit final. Utilisée en complément d'autres outils comme le test de croissance, la microbiologie prévisionnelle permet d'extrapoler les résultats obtenus en laboratoire à des scénarii réels de conservation de l'aliment (Koutsoumanis 2001). Dans la démarche HACCP, la microbiologie prévisionnelle peut intervenir à différentes étapes du processus. Par exemple, lors de la détermination des limites de tolérance à affecter aux points critiques, la modélisation permet d'évaluer ces limites en associant pour chaque niveau une contamination prévue en fin de durée de vie. Grâce à la microbiologie prévisionnelle, il est également possible de déterminer à l'avance les actions correctives à appliquer en cas de défaillance, telle une modification du traitement thermique par exemple. Enfin, la microbiologie prévisionnelle étant reconnue par les autorités de contrôle, il est tout à fait possible d'utiliser les résultats de simulations en tant qu'éléments de preuve pour montrer à un inspecteur que le produit est sûr (Thuault and Couvert 2009).

### Exemple 1 : Optimisation de la formulation d'un produit de charcuterie : la saucisse crue

La saucisse crue est un produit de charcuterie fumé à froid et composé de viande de bœuf et de gras de porc. Dans cet exemple, la formulation permettant de produire des saucisses crues d'une durée de vie microbiologique de 16 jours est optimisée. En effet, les caractéristiques physico-chimiques (pH et aw) de cet aliment permettent la croissance de *Listeria monocytogenes*. L'aliment est donc classé en produit « sensible » de catégorie 3 selon la classification des aliments du point de vue du risque lié à la présence de *L. monocytogenes* (Saisine de l'AFSSA n°2003-SA-0362). L'inhibition de la croissance du pathogène permettrait de classer l'aliment dans la catégorie 2 et de garantir que les denrées mises sur le marché ne contiennent pas *L. monocytogenes* à un niveau supérieur au seuil réglementaire de 100 UFC/g. Pour cela, il est envisageable de modifier la formulation par l'ajout d'un inhibiteur tel que l'acide lactique. Cet ajout est autorisé par la réglementation, mais doit se limiter aux doses strictement nécessaires. Il est ainsi possible de tester plusieurs doses et de voir l'impact sur le résultat des simulations du développement de *L. monocytogenes* pour retenir la formulation la plus appropriée.

Dans cet exemple, le logiciel Sym'Previsus a été utilisé pour évaluer l'impact de la variabilité des paramètres physico-chimiques de la saucisse crue sans additif sur la probabilité de croissance de *L. monocytogenes*. Une étude expérimentale a permis de calculer le pH moyen de cet aliment, estimé à  $5,66 \pm 0,07$  ainsi que l'aw moyenne, estimée à  $0,954 \pm 0,010$ . La Figure 1 montre une probabilité de croissance élevée (90% en moyenne) de *L. monocytogenes* dans cette matrice.

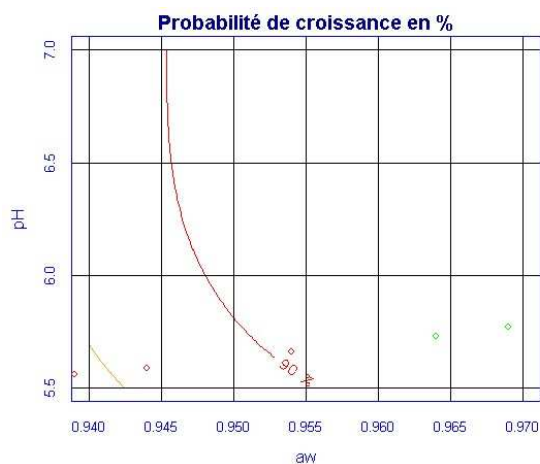
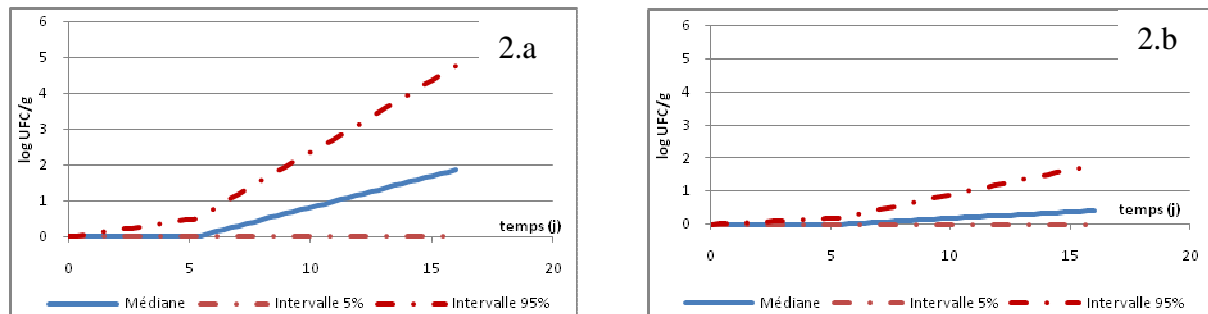


Figure 1. Probabilité de croissance (en %) de *L. monocytogenes* dans les saucisses crues en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques. Les points représentent des mesures de pH et d'aw de saucisses crues.

Le logiciel permet également de simuler la cinétique de croissance du pathogène pour des conditions de stockage raisonnablement prévisibles : 1/3 de la DVM à 4°C et 2/3 à 8°C. La contamination initiale a été fixée à 1 bactérie /10 g. La vitesse de croissance a été déduite à partir des résultats d'un test de croissance réalisé sur ce produit et qui a permis d'estimer un taux de croissance optimal de  $0,63h^{-1} \pm 0,04$ .



**Figure 2. Cinétiques de croissance de *L. monocytogenes* dans les saucisses crues en fonction du temps en absence (2.a) et en présence d'une dose de 2,5% d'acide lactique (2.b). Les traits pleins représentent le comportement médian et les traits discontinus représentent les bornes de confiance à 90%.**

La Figure 2.a montre qu'en absence d'acide lactique, et pour un niveau de contamination initiale de 1 UFC/10g, la croissance médiane de *L. monocytogenes* permet d'atteindre le seuil réglementaire de 2 log UFC/g en fin de DLC. En prenant en compte la variabilité liée aux paramètres physico-chimiques, la croissance du pathogène peut dans certains cas atteindre les 5 log UFC/g (intervalle 95%). En ajoutant une dose d'acide lactique de 2,5% (Figure 2.b), les résultats de simulation montrent que le seuil réglementaire de 2 log UFC/g n'est jamais atteint tout au long de la durée de vie du produit, même en tenant compte de la variabilité physico-chimiques. En se basant sur ces résultats, il devient possible de classer le produit dans la catégorie 2 puisqu'il ne contient pas *L. monocytogenes* à un niveau supérieur au seuil réglementaire pendant toute la durée de vie.

### Exemple 2 : Détermination de la durée de vie de viande de porc fraîche conditionnée en unités de vente consommateur (UVC)

Le recours à la simulation est possible pour déterminer la durée de vie microbiologique des aliments et évaluer l'impact de différents scénarii de conservation sur la contamination microbienne. Pour cela, il convient d'identifier et d'étudier le micro-organisme dont le développement conditionne la qualité microbiologique du produit avant de réaliser les simulations. Dans cet exemple, le comportement de *Pseudomonas* dans la viande de porc fraîche conditionnée en UVC a servi de base pour valider une durée de vie de 7 jours.

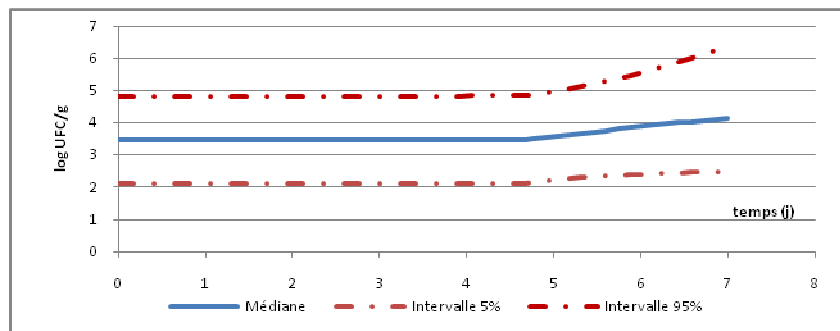
Des données d'autocontrôle ont permis de connaître la contamination initiale en *Pseudomonas* ( $N_0$ ) ainsi que les paramètres physico-chimiques (pH et aw) de ce type de produit et de caractériser la variabilité qui leur est associée. Des données issues de précédentes études réalisées à l'IFIP ont également permis de caractériser la variabilité associée au taux de croissance optimum de *Pseudomonas* dans la viande de porc ( $\mu_{opt}$ ) ainsi que celle associée à sa densité de population maximale  $N_{max}$ . Un temps de latence nul a été utilisé pour représenter des conditions sécuritaires. Ces données sont présentées dans le Tableau 1. Les caractéristiques de croissance de *Pseudomonas* (valeurs cardinales de température, de pH et d'aw) ont été obtenues à partir de la littérature (Robles-Olvera 1999).

**Tableau 1. Paramètres de croissance de *Pseudomonas* dans la viande de porc fraîche**

Paramètre	Dénomination	Valeur
Temps de latence	<i>lag</i>	0±0
Contamination initiale	$N_0$	3,47±0,81
Contamination maximale	$N_{max}$	10,37±0,15
Taux de croissance optimal	$\mu_{opt}$	1,099±0,031

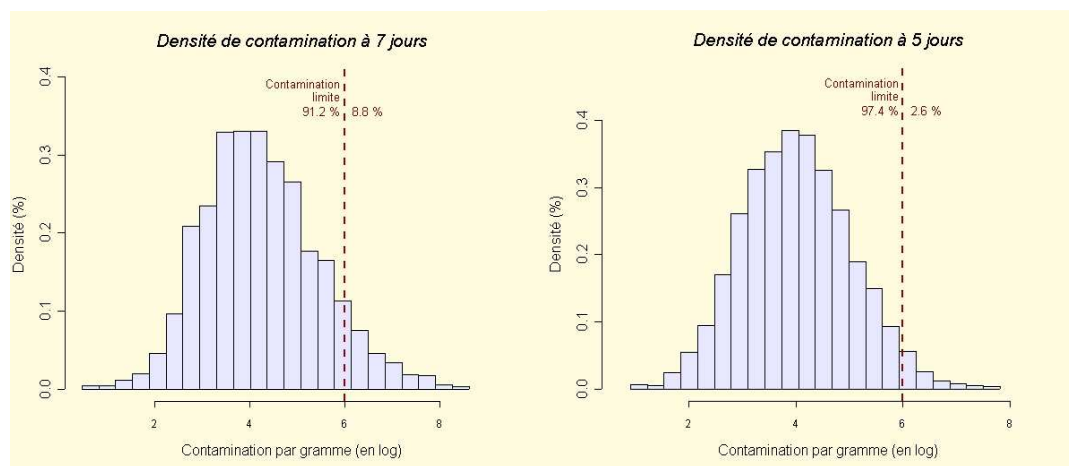
Potentiel d'hydrogène	pH	6,09±0,14
Activité de l'eau	aw	0,994±0,001

Une fois les paramètres de croissance caractérisés, le logiciel Sym'Previus a été utilisé pour valider une durée de vie microbiologique de 7 jours avec une conservation à 4°C pendant 2/3 de la durée de vie, suivie d'une conservation à 8°C. Les résultats des simulations sont donnés dans la Figure 3.



**Figure 3. Cinétiques de croissance de *Pseudomonas* dans la viande de porc fraîche en fonction du temps. Les traits pleins représentent le comportement médian et les traits discontinus représentent les bornes de confiance à 90%.**

Cette figure montre que pour 50% des cas (comportement médian) la contamination obtenue au bout des 7 jours est inférieure au seuil des 6 log UFC/g proposé par le guide des bonnes pratiques d'Hygiène. La Figure 3 montre néanmoins que, en tenant compte de la variabilité physico-chimique, dans certains cas, les produits peuvent présenter des niveaux supérieurs à cette limite. Le logiciel permet de visualiser la proportion d'UVC dont la contamination à la fin de la durée de vie dépasse les 6 log UFC/g et qui sont jugés non conformes (Figure 4.a). Cette proportion est estimée à près de 9% lorsque la DLC est de 7 jours. Pour diminuer le nombre de produits non conformes, il est possible de réduire la DLC par exemple à 5 jours et de refaire les simulations. La Figure 4.b montre que cette réduction de 2 jours permet de limiter le nombre de non conformes à un niveau inférieur à 3%, soit un niveau 3 fois moins important que celui obtenu pour une DLC de 7 jours.



**Figure 4. Densité de contamination de *Pseudomonas* dans la viande de porc fraîche stockée pendant 7 jours (4.a) et 5 jours (4.b) selon le scénario thermique 2/3 durée de vie à 4°C et 1/3 DVM à 8°C.**

Il est également possible de diminuer le nombre de non conformités en limitant la contamination initiale. Ainsi, une diminution d'une unité log en moyenne de ce paramètre est plus efficace qu'une réduction de la durée de vie être puisqu'elle permet de réduire la proportion de non conforme de 2,3% à 8,8% pour une durée de vie de 7 jours en 2/3 à 4°C et 1/3 à 8°C.

## Conclusion

La microbiologie prévisionnelle est donc un outil très utile qui présente des applications concrètes en industrie. Elle permet de soutenir l'innovation et d'accélérer le développement de nouveaux produits. Elle permet également d'évaluer des mesures de maîtrise et des mesures de gestion sur la qualité et la sécurité d'un aliment. Les résultats obtenus dépendent néanmoins fortement de la qualité des données de calibrage. Il est donc nécessaire de veiller à bien caractériser le couple aliment / micro-organisme étudié. De plus, même si les modèles utilisés sont de plus en plus complets, il reste difficile de modéliser de manière très fine les écosystèmes complexes que sont les aliments et les modèles restent souvent sécuritaires, notamment en ce qui concerne la prévision du temps de latence.

## References

- Augustin,J.-C., Zuliani,V., Cornu,M. and Guiller,L. (2005) Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 1019-1042.
- Baranyi,J. and Roberts,T.A. (1994) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* **23**, 277-294.
- Buchanan,R.L. and Philips,J.G. (2000) Updated models for the effects of theperature, initial pH, NaCl and NanO2 on aerobic and anaerobic growth of *Listeria monocytogenes*. *Quantitative Microbiol.* **2**, 103-108.
- Buchanan,R.L. and Whiting,R.C. (1996) Risk assessment and predictive microbiology. *J. Food Prot.* **Supplement**, 31-36.
- Carrasco,E., Valero,A., Perez-Rodriguez,F., Garcia-Gimeno,R.M. and Zurera,G. (2007) Management of microbial safety of ready to eat meat products by mathematical modeling : *Listeria monocytogenes* as an example. *Int. J. Food Microbiol.***114**, 221-226.
- Coll Cardenas,F., Giannuzzi,L. and Zaritzky,N.E. (2008) Mathematical modelling of microbial growth in ground beef from Argentina. Effect of lactic acid addition, temperature and packaging film. *Meat Scie.* **79**, 509-520.
- Dalgaard,P. (1995) Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed fresh fish. *Int. J. Food Microbiol.* **26**, 305-317.
- Delignette-Muller,M.-L., Rosso,L. and Flandrois,J.P. (1995) Accuracy of microbial growth predictions with square roots and polynomial models. *Int. J. Food Microbiol.* **27**, 139-146.
- Dominguez,S.A. and Schaffner,D.W. (2007) Development and validation of a mathematical model to describe the growth of *Pseudomonas* spp. in raw poultry stored under aerobic conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 287-295.
- Drosinos,E.H., Mataragas,M., Veskovic-Moracanin,S., Gasparik-Reichardt,J., Hadziosmanovic,M. and Alagic,D. (2006) Quantifying nonthermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in European fermented sausages using bacteriocinogenic lactic acid bacteria or their bacteriocins: a case study for risk assessment. *J. Food Prot.* **69**, 2648-2663.
- Giovannini,A., Prencipe,V., Conte,A., Marino,L., Petrini,A., Pomilio,F., Rizzi,V. and Migliorati,G. (2004) Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. *Food Control* **15**, 139-144.

- Koutsoumanis,K. (2001) Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1821-1829.
- Koutsoumanis,K. (2009) Modeling food spoilage in microbial risk assessment. *J. Food Prot.* **72**, 425-427.
- Liu,F., Yang,R.Q. and Li,Y.F. (2006) Correlations between growth parameters of spoilage micro-organisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at -2, 4 and 10°C. *Food Microbiol.* **23**, 578-583.
- McMeekin, T. A., Olley, J., Ross, T. and Ratkowsky, D. A. (1993) *Predictive Microbiology. Theory and Application.* Tanton, UK: John Wiley and Sons.
- Membré,J.M., Leporq,B., Vialette,M., Mettler,E., Perrier,L., Thuault,D. and Zwietering,M. (2005) Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. *Int. J. Food Microbiol.* **100**, 179-186.
- Robles-Olvera, V. (1999) Comparaison de la croissance de *Pseudomonas* species et *Listeria* species en milieu liquide et en viande de boeuf . Thèse de Doctorat, Université Blaise Pascal, Clermont Ferrand.
- Ross,T. and McMeekin,T.A. (2003) Modeling microbial growth within food safety risk assessment. *Risk Analysis* **23**, 179-197.
- Ross,T., Dalgaard,P. and Tienungoon,S. (2000) Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int. J. Food Microbiol.* **62**, 231-245.
- Rosso,L., Lobry,J.R., Bajard,S. and Flandrois,J.P. (1995) Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl. Env.Microbiol.* **61**, 610-616.
- Seman,D.L., Borger,A.C., Meyer,J.D., Hall,P.A. and Milkowsky,A.L. (2002) Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in cured ready to eat processed meat products by manipulation of sodium chloride, sodium diacetate, potassium lactate and product moisture content. *J. Food Prot.* **65**, 651-658.
- Shimoni,E. and Labuza,T.P. (2000) Modeling pathogen growth in meat products: future challenges. *Trends Food Sci.Technol.* **11**, 394-402.
- Thuault,D. and Couvert,O. (2009) La simulation du comportement des micro-organismes dans les aliments. *Rev. Gen. Froid cond.air* **1090**, 45-50.
- Zwietering,M., Wijtzes,T., DeWit,J.C. and Van'tRiet,K. (1992) A decision support system for the prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Food Prot.* **55**, 973-979.