

LA DECONTAMINATION DES COQUILLES DES OEUFS VIS-A-VIS DE *BACILLUS CEREUS*

Jocelyne Protais, Eric Jouy, Evelynne Boscher, Gilles Salvat, Pierre Colin

CNEVA - Beaucemaine - BP 53 - 22440 Ploufragan

Résumé

La décontamination des coquilles des oeufs vis-à-vis de *Bacillus cereus* a été étudiée en appliquant par aspersion un produit à base de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique, dans les conditions expérimentales de laboratoire. Les conditions optimales d'utilisation, tant pour une efficacité maximale vis-à-vis des spores de *Bacillus cereus* que pour une application industrielle, sont les suivantes : une concentration de 2,5%, un temps de contact de 3 minutes et une température de 20°C à 40°C.

Abstract

Egg shell decontamination for *Bacillus cereus* has been studied by using a compound containing hydrogen peroxyde and peracetic acid. The optimal conditions of utilisation are the following : 2.5% concentration, 3 minutes contact time and a range of temperature from 20°C to 40°C.

Introduction

La présence de *Bacillus spp.*, notamment *Bacillus cereus*, dans les industries agro-alimentaires, est très aléatoire et souvent observée au cours de l'été. Les *Bacillus* sont des bactéries mésophiles capables de se développer à des températures de 30°C-37°C, mais aussi à basse température (FOEGEDING et STANLEY, 1987). Elles peuvent former en milieu aérobie, des spores résistantes à la température (BALL et al., 1987 ; WOOD et WAITES, 1988) et à de nombreux agents chimiques (KRAMER et al., 1982 ; WOOD et WAITES, 1988). Ces microorganismes, parmi bien d'autres, sont mis en évidence sur la coquille des oeufs et dans les ovoproduits (BOARD, 1966 ; SHAFI et al, 1970 ; MAYES et TAKEBALLI, 1983 ; BOARD et TRANTER, 1986). De nombreuses méthodes chimiques de décontamination vis-à-vis de *Bacillus* ont déjà été testées en employant soit des désinfectants, soit des conservateurs (HUGHEY et JONHSON, 1987 ; HURST cité par WONG et CHEN, 1988 ; DELVES-BROUGHTON et al., 1992 ; DOBBENIE et al., 1995). Dans ce même objectif, l'efficacité d'un produit à base de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique, appliqué par aspersion sur les coquilles d'oeufs, a été évaluée.

Matériel et méthodes

1. Préparation et dénombrement de la suspension de spores

A partir de colonies de *Bacillus cereus* prélevées sur milieu de Mossel (Réf. AES : AEB 121740), des suspensions de spores ont été préparées puis ensemencées sur des géloses nutritives mises en incubation pendant 48 heures à 30°C. Après

récupération et centrifugation, les suspensions de spores et leurs dilutions successives ont été dénombrées sur ce même milieu de MOSSSEL, incubées pendant 24 heures à 30°C.

Cette méthode permet donc d'obtenir une production régulière de spores de *Bacillus cereus*, facilement dénombrable, contenant de l'ordre de 10^8 spores par ml après 15 à 30 jours de stockage à 4°C.

2. Contamination des oeufs par des spores de *Bacillus cereus*

La contamination artificielle de manière homogène avec des spores de *Bacillus cereus* a été réalisée par une immersion des oeufs par lot de 3, puis une agitation manuelle, dans une suspension telle que la contamination moyenne soit de l'ordre de $2,2 \cdot 10^3$ spores par cm^2 de coquille. Puis les oeufs ont été retirés et séchés.

3. Décontamination des oeufs

L'efficacité sporicide du produit 'P3-oxonia actif' (HENKEL) a été étudiée en le pulvérisant directement sur la coquille des oeufs artificiellement contaminés, puis en contrôlant la contamination résultante, après un égouttage et un séchage de l'oeuf dans un plateau stérile.

Le contrôle de la contamination de la surface de la coquille a été effectué à partir du liquide recueilli après agitation manuelle des oeufs dans de l'eau peptonée.

4. Recherche de la concentration sporicide du produit "P3-oxonia Actif"

Lors des opérations de nettoyage et de désinfection, les concentrations habituellement utilisées pour ce

produit vont de 0,05% (bactéricide) à 0,2% (virucide) et à 2% (fongicide).

Etant donné la résistance des spores bactériennes, les concentrations de 1%, 1,5%, 2% et 2,5% ont été testées, sachant que des concentrations supérieures entraîneraient, au niveau industriel, un risque pour le personnel (émission de vapeurs autour de la machine) ainsi que des risques de corrosion pour certains matériaux.

Une pulvérisation de ces différentes concentrations du produit 'P3-oxonia actif' a été effectuée à température ambiante (20°C) et pendant 6 secondes sur des oeufs artificiellement contaminés. Le séchage des oeufs a été réalisé naturellement sous hotte à flux laminaire, pendant un temps de contact d'environ 3 minutes avant le contrôle de la contamination résultante.

Simultanément, l'action de l'alcool à 70% (non sporicide) a été testée afin de s'assurer que la diminution éventuellement observée de la contamination des coquilles avec le produit 'P3-oxonia actif', soit bien due à une destruction des spores et non à une action parasite telle que l'entraînement des spores lors de l'égouttage de l'oeuf ou une fragilité excessive des spores.

5. Effet du temps de contact sur l'activité sporicide du produit "P3-oxonia actif"

Le 'P3-oxonia actif' a été utilisé à une concentration de 2,5% pendant des temps de contact de 2, 3 et 4 minutes. La méthode de désinfection est restée inchangée et le séchage des oeufs a été effectué à l'aide d'un sèche-cheveux.

6. Effet de la température du produit "P3-oxonia actif" sur l'activité sporicide

L'influence de deux températures d'utilisation du produit sur l'efficacité sporicide a été étudiée : 20°C (lot 1) et 40°C (lot 2). La méthode de désinfection n'a pas été modifiée. Le produit a été porté à 40°C au bain-marie et le séchage des oeufs a été effectué de façon naturelle.

Résultats

1. Recherche de la concentration sporicide du produit "P3-oxonia Actif"

Six lots présentant les caractéristiques suivantes ont été constitués :

- lot 1 : oeufs non désinfectés ;
- lot 2 : oeufs désinfectés à l'alcool à 70% ;
- lot 3 : oeufs désinfectés au P3-oxonia actif à 1% ;
- lot 4 : oeufs désinfectés au P3-oxonia actif à 1,5% ;
- lot 5 : oeufs désinfectés au P3-oxonia actif à 2% ;
- lot 6 : oeufs désinfectés au P3-oxonia actif à 2,5%.

Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

TABLEAU 1 : Recherche de la concentration sporicide du P3-oxonia actif

Lots	Moyenne
Lot 1	$3,2 \cdot 10^3$
Lot 2	$2,2 \cdot 10^3$
Lot 3	$1,9 \cdot 10^3$
Lot 4	$1,3 \cdot 10^3$
Lot 5	$7,7 \cdot 10^2$
Lot 6	$2,6 \cdot 10^2$

Le 'P3-oxonia actif' à une concentration de 2,5%, à une température de 20°C et pendant un temps de contact de 3 minutes, entraîne une diminution significative d'environ 1 log du nombre de spores de *Bacillus cereus* présentes à la surface des oeufs ($p=0,014$).

2. Effet du temps de contact sur l'activité sporicide du produit "P3-oxonia actif"

Quatre lots ont ainsi été constitués :

- lot 1 : désinfection à l'alcool 70% avec un temps de contact de 2 minutes ;
- lot 2 : désinfection au P3-oxonia actif à 2,5%, avec un temps de contact de 2 minutes ;
- lot 3 : désinfection au P3-oxonia actif à 2,5%, avec un temps de contact de 3 minutes ;
- lot 4 : désinfection au P3-oxonia actif à 2,5%, avec un temps de contact de 4 minutes.

Les résultats sont présentés dans le tableau 2.

TABLEAU 2 : Effet du temps de contact sur l'activité sporicide du P3-oxonia actif

Lots	Moyenne
lot 1	$8,9 \cdot 10^3$
lot 2	$2,9 \cdot 10^3$
lot 3	$1,7 \cdot 10^3$
lot 4	$1,1 \cdot 10^3$

La comparaison entre la désinfection à l'alcool (lot 1) et celle au 'P3-oxonia actif' à 2,5% pendant 2 minutes (lot 2) confirme l'activité sporicide de ce produit ($p=0,021$).

La différence d'efficacité est significative entre 2 et 3 minutes de contact ($p=0,021$) mais pas entre 3 et 4 minutes ($p=0,11$).

Le temps de contact optimal pour l'activité sporicide du 'P3-oxonia actif' à la concentration de 2,5%, serait donc de 3 minutes.

3. Effet de la température du produit "P3-oxonia actif" sur l'activité sporicide

Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

TABEAU 3 : Influence de la température du produit "P3-oxonia actif" sur son activité sporicide

Lots	Moyenne
lot 1 (20°C)	$1,5 \cdot 10^3$
lot 2 (40°C)	$1,2 \cdot 10^3$

L'analyse statistique montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux lots ($p=0,248$). Une augmentation de 20°C à 40°C, dans nos conditions expérimentales, n'entraîne pas d'amélioration de l'efficacité sporicide.

Ceci peut s'expliquer par le fait que le produit se refroidit très vite sur la surface de la coquille. L'impact serait peut-être différent au niveau industriel car la désinfection des oeufs est effectuée en général dans une enceinte fermée, qui assure un meilleur maintien de la température.

Conclusion

Cette étude a permis de contribuer à une meilleure connaissance de *Bacillus cereus*, en apportant des moyens de lutte supplémentaires à ceux déjà décrits dans la bibliographie, pour limiter, voire entraver le développement de ce microorganisme, plus particulièrement de ses spores. Les conditions optimales d'utilisation du produit "P3-oxonia actif" vis-à-vis de *Bacillus cereus* sont les suivantes : une concentration de 2,5%, un temps de contact de 3 minutes et une température de 20°C à 40°C.

Toutefois, il convient de rappeler que les contaminations par *Bacillus cereus* ne sont pas à attribuer systématiquement aux oeufs et ovoproduits, cette bactérie étant omniprésente dans l'environnement de la plupart des ateliers de fabrication. Cependant, bien que les toxi-infections alimentaires à *Bacillus cereus* soient très rarement observées, une vigilance et une attention toutes particulières sont à maintenir dans les industries agro-alimentaires, afin d'éviter la présence de ce microorganisme, surtout sous sa forme sporulée.

Références

Ball H.R., Hamid-Samim M., Foegeding P.M., Swartzel K.R., 1987. Fonctionnalité et microbienne stabilité of ultrapasteurized, aseptically packaged refrigerated whole egg. *Journal of Food Science*, 52, 1212-1218

Board R.G., 1966. The course of microbial infection of the hen's egg. *Journal of applied bacteriology* 29, 319-341

Board R.G., Tranter H.S., 1986. The micro-biology of eggs. In : *Egg science and technology third edition*, p.75-94, AVI Publishing Co., Westport

Delves-Broughton J., Williams G.C., Wilkinson S., 1992. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in pasteurized whole egg. *Letters in Applied Microbiology*, 15, 133-136

Dobbenie D., Uyttendaele M., Debe-Vere J., 1995. Antibacterial activity of the glucose oxydase/glucose system in liquid whole egg. *Journal of Food Protection*, 58, 273-279

Foegeding P.M., Stanley N.W., 1987. Growth and inactivation of microorganisms isolated from ultrapasteurized egg. *Journal of food science*, 52, 1219-1227

Hughey V.L., Johnson E.A., 1987. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2165-2170

Kramer J.M., Turnbull P.C.B., Munshi G., Gilbert R.J., 1982. Identification and characterization of *Bacillus cereus* species associated with food and food poisoning. *Technical Series-Society for Applied Bacteriology*, 17, 261-286

Mayes F.J., Takeballi M.A., 1983. Microbial contamination of hen's egg. *Journal of Food Protection*, 46, 1092-1098

Shafir R., Cotteril O., Nichols M.C., 1970. Microbial flora of commercially pasteurized egg products. *Poultry Science*, 49, 578-585

Wood S.L., Waites W.M., 1988. Factors affecting the occurrence of *Bacillus cereus* in liquid whole egg. *Food Microbiology*, 5, 103-107

Wong H., Chen Y., 1988. Effects of lactic acid bacteria and organic acids on growth and germination of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2179-2184