



Interreg

ALCOTRA

Fonds européen de développement régional
Fondo europeo di sviluppo regionale



UNION EUROPÉENNE
UNIONE EUROPEA

PROGETTO Alcotra n° 1733

ESSICA

WP3.1.5 Etude
bibliographique sur les
micro-organismes et
insectes d'intérêt majeur
pour les espèces
aromatiques identifiées

23/11/2017



Le Terre
dei Savoia



DISAFA
Università degli studi di Torino



FranceAgriMer



CRIEPPAM

SOMMAIRE

| | |
|--|----|
| PREAMBULE..... | 3 |
| [1]. MICROBIOLOGIE DES HERBES AROMATIQUES..... | 4 |
| [2]. RÉGLEMENTATION CONCERNANT LES PARAMÈTRES MICROBIOLOGIQUES DANS LES HERBES AROMATIQUES | 6 |
| [3]. RÉGLEMENTATION ET APPLICATIONS DE L'OZONE DANS LE DOMAINE ALIMENTAIRE | 8 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 10 |

PREAMBULE

Au fil des années, la conscience du consommateur a augmenté considérablement dans le domaine alimentaire. L'acheteur est devenu de plus en plus exigeant et cherche des produits étant sûrs et de qualité. À cet égard, les herbes aromatiques font à présent l'objet d'un fort intérêt et leur usage dans le domaine alimentaire a fait en sorte que la communauté scientifique prête une plus grande attention à leur qualité organoleptique et à leur sécurité microbiologique, en plus qu'à la possibilité d'étendre leur durée de conservation.

S'il est vrai que les herbes aromatiques, lorsqu'elles sont séchées, présentent un risque microbiologique contenu grâce à la faible activité de l'eau, il est tout aussi vrai que les matières premières fraîches peuvent représenter un important bassin de contamination microbienne, ainsi que certaines des étapes ultérieures de transformation, de conditionnement et de conservation. Avec l'expérimentation et la mise au point de techniques innovantes de transformation et de conditionnement des herbes aromatiques, ce projet répond à la demande, venant notamment des opérateurs du secteur, d'accroître la qualité et la sécurité de leurs productions.

Ce rapport sur l'état de l'art actuel des aspects microbiologiques de certaines herbes aromatiques fraîches et séchées montre que l'expérimentation et les informations à ce sujet sont relativement insuffisantes. En effet, bien que la plupart des échantillons étudiés [1] se soient avérés conformes aux réglementations européennes et italiennes en vigueur en la matière [2], la rareté des données impose la réalisation d'une étude approfondie tant pour enrichir les connaissances sur le risque microbiologique des matières premières que pour évaluer l'efficacité de techniques innovantes, comme le séchage à froid, sur la qualité microbiologique de ces végétaux.

Enfin, dans ce rapport, nous avons examiné l'état de l'art en ce qui concerne l'utilisation de l'ozone [3] pour contenir les charges microbiennes des herbes aromatiques et des épices, ce qui représente un volet de grand intérêt et d'actualité dans le secteur alimentaire. La rareté des données expérimentales en bibliographie, bien qu'encourageantes en termes de résultats, rend nécessaire la réalisation d'un approfondissement expérimental adéquat pour confirmer ou pas l'efficacité et l'applicabilité de l'utilisation de ce gaz. Ce qui est connu et rapporté, à cet égard, doit donc être un point de départ pour l'optimisation des paramètres à tester et évaluer dans ce projet.

[1]. MICROBIOLOGIE DES HERBES AROMATIQUES

Certaines herbes aromatiques, telles que le basilic, le thym, le romarin, l'origan, la menthe, la sauge, ont été étudiées pour l'évaluation de la charge de principaux groupes microbiens indiquant la qualité et/ou la présence de micro-organismes pathogènes. Les résultats principaux sont résumés dans le tableau 1 ci-dessous.

Selon les études, la charge mésophile aérobie des herbes séchées présente des charges allant de 10^3 à 10^6 ufc/g, tandis que pour les herbes fraîches les charges dépassent généralement 10^6 ufc/g. Dans certaines études, on a également évalué la charge thermophile aérobie avec des valeurs étant inférieures d'environ un log à la charge mésophile des mêmes herbes.

En ce qui concerne par contre les micro-organismes indiquant la qualité, tels que les levures et les moisissures, les premières ont été détectées, dans la plupart des études, avec des charges inférieures à 10 ufc/g, tandis que les champignons mycéliens sont généralement présents avec des charges allant de 10 à 10^3 ufc/g. Enfin, les coliformes ont été isolés avec des charges maximales de 10^4 ufc/g dans les herbes fraîches, alors que le processus de séchage semble diminuer les charges à des valeurs inférieures à 10 ufc/g.

La recherche de micro-organismes potentiellement pathogènes dans les herbes séchées montre que le risque microbiologique est relativement faible dans ce type de matrice. Dans les études dont au tableau 3, on a constaté que *Salmonella spp.*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* et *E. coli* étaient absents des échantillons d'herbes analysés dans l'étude, à l'exception de l'*E. coli* isolé occasionnellement dans des échantillons frais de menthe, sauge et coriandre. Des *Cronobacter*, dans le basilic et le persil, et des *C. perfringens*, dans la menthe, la sauge et la coriandre ont été isolés dans des échantillons frais avec des charges inférieures à 10^2 ufc/g. Le *B. cereus*, par contre, a atteint des charges comprises entre 10 et 10^2 ufc/g, plus rarement entre 10^3 et 10^4 ufc/g dans les échantillons de thym, romarin et basilic.

Tableau 1. Aperçu de quelques-unes des études expérimentales les plus récentes dans le cadre de l'étude microbiologique des herbes aromatiques.

BASILIC

| RÉFÉRENCE | CIBLE MICROBIENNE | CHARGE MICROBIENNE (UFC/g) | |
|---------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Fogele, 2017 | Moisissures | Valeur minimale LOG 1,20 ± 0,17 | Valeur maximale LOG 3,56 ± 0,09 |
| | <i>B. cereus</i> | Valeur minimale LOG 1,40 ± 0,17 | Valeur maximale LOG 2,98 ± 0,03 |
| Garbowska, 2015 | Micro-organismes aérobies mésophiles | >10 ⁵ -10 ⁶ | |
| | <i>Cronobacter</i> spp. | présent | |
| Wojcik, 2009 (*) | Micro-organismes aérobies mésophiles | LOG 5,26 | |
| | Micro-organismes aérobies thermophiles | LOG 4,62 | |
| | Moisissures | 5,2 x 10 | |
| | Levures | < 3,0 x 10 | |
| | Coliformes | > 0,1 | |
| | <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> | absent | |

*: basilic séché

THYM

| RÉFÉRENCE | CIBLE MICROBIENNE | CHARGE MICROBIENNE (UFC/g) | |
|---------------------|--|--|--------------------------------|
| Fogele, 2017 | Moisissures | Valeur minimale 1,26 ± 0,24 | Valeur maximale 3,00 ± 0,05 |
| | <i>B. cereus</i> | Valeur minimale 1,94 ± 0,15 | Valeur maximale 2,24 ± 0,08 |
| Garbowska, 2015 | Micro-organismes aérobies mésophiles | >10 ³ -10 ⁴ (4 échantillons) >10 ⁴ -10 ⁵ (2 échantillons) | |
| | Micro-organismes aérobies mésophiles | LOG 4,21 | |
| Wojcik, 2009 (*) | Micro-organismes aérobies thermophiles | LOG 3,67 | |
| | Moisissures | < 10 UFC/g | |
| | Levures | < 10 UFC/g | |
| | Coliformes | > 0,1 (niveau maxi enregistré) | |
| | <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> | absent | |

*: thym séché

ROMARIN

| RÉFÉRENCE | CIBLE MICROBIENNE | CHARGE MICROBIENNE (UFC/g) | |
|------------------------|---|-----------------------------------|--------------------------------|
| Fogele, 2017 | Moisissures | Valeur minimale 1,10 ± 0,17 | Valeur maximale 1,76 ± 0,15 |
| | <i>B. cereus</i> | Valeur minimale 2,04 ± 0,04 | Valeur maximale 2,04 ± 0,04 |
| Garbowska, 2015 (*) | Micro-organismes aérobies mésophiles | >10 ⁴ -10 ⁵ | |

*: romarin séché

ORIGAN

| RÉFÉRENCE | CIBLE MICROBIENNE | CHARGE MICROBIENNE (UFC/g) |
|---------------------|--|--|
| Garbowska, 2015 | Micro-organismes aérobies mésophiles | >10 ² -10 ³ (2 échantillons) >10 ³ -10 ⁴ (2 échantillons) >10 ⁵ -10 ⁶ (2 échantillons) |
| Wojcik, 2009 (*) | Micro-organismes aérobies mésophiles | LOG 3,48 |
| | Micro-organismes aérobies mésophiles | LOG 2,58 |
| | Moisissures | < 10 UFC/g |
| | Levures | absent |
| | Coliformes | > 0,1 (niveau maxi enregistré) |
| | <i>Salmonella</i> spp., <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> | absent |

*: origan séché

AUTRES HERBES

| RÉFÉRENCE | HERBE | CIBLE MICROBIENNE | CHARGE MICROBIENNE |
|-----------------|---|--|--|
| Garbowska, 2015 | PERSIL | Micro-organismes aérobies mésophiles | >10 ³ -10 ⁴ (3 échantillons) >10 ⁴ -10 ⁵ (2 échantillons) |
| | | <i>Cronobacter</i> spp. | présent |
| Sagoo, 2009 | SAUGE | <i>Salmonella</i> spp. | absent |
| | CORIANDRE | <i>E. coli</i> | <10 (22 échantillons) >10 ² (1 échantillon) |
| | | <i>B. cereus</i> | <10 ³ (16 échantillons) <10 ³ -10 ⁴ (5 échantillons) ≥ 10 ⁴ (2 échantillons) |
| | MENTHE | <i>C. perfringens</i> | <10 ² (22 échantillons) >10 ³ (1 échantillon) |
| Vitullo, 2011 | HERBES FRAÎCHES (parmi lesquelles la sauge) | <i>Salmonella</i> spp. <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> | absent |
| | | Micro-organismes aérobies mésophiles | >10 ⁶ (29,4 % des échantillons) |
| | | Coliformes totaux | <10 ⁴ UFC/g |

[2]. RÉGLEMENTATION CONCERNANT LES PARAMÈTRES MICROBIOLOGIQUES DANS LES HERBES AROMATIQUES

Les critères adoptés en Italie pour évaluer la sécurité et la qualité microbiologique des herbes aromatiques, y compris les herbes séchées, se réfèrent principalement à la réglementation européenne Rec. 2004/24/CE (annexe 1). Les paramètres considérés par cette réglementation et les valeurs recommandées sont indiqués dans le tableau 2 et concernent les *Enterobacteriaceae*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus* présumé et *Clostridium perfringens*. En outre, des valeurs de sécurité microbiologique pour *Escherichia coli* (tableau 2) ont également été établies sur la base du Rec. 2004/24/CE et de l'étude menée, en 2004, par l'European Spice Association (ESA ou Association européenne des épices) (annexe 2). En ce qui concerne la *Listeria monocytogenes*, en revanche, la réglementation italienne renvoie aux dispositions du règlement CE 2073/05 (annexe 3) pour les aliments considérés comme n'étant pas à risque de contamination par cet agent pathogène.

Étant donné que la réglementation européenne susmentionnée ne fait pas référence aux paramètres microbiologiques liés à la qualité et à la durée de conservation des herbes aromatiques, tels que les micro-organismes aérobies mésophiles, les levures et les moisissures, en Italie, la Région Piémont a élaboré des lignes directrices (D. D. n°. 780 du 18.11.2011 (annexe 4) pour combler le vide réglementaire à cet égard. En effet, à la suite d'un approfondissement scientifique, des valeurs guides ont été établies pour les épices et les herbes aromatiques concernant la charge des micro-organismes aérobies mésophiles et des moisissures (tableau 2).

Tableau 2. Paramètres microbiologiques de référence pour évaluer la qualité et la sécurité microbiologique des herbes aromatiques.

| PARAMÈTRES | VALEURS GUIDES RECOMMANDÉES (ufc/g) | RÉFÉRENCES |
|--|---|--|
| Micro-organismes aérobies mésophiles | Satisfaisant : $<5 \times 10^5$ Acceptable : $5 \times 10^5 \leq x < 5 \times 10^6$ Non satisfaisant : $\geq 5 \times 10^6$ | Région Piémont (D.D. n°. 780 du 18.11.2011) Ottaviani (1996) |
| Moisissures | Satisfaisant : $<10^3$ Acceptable : $10^3 < x < 10^4$ Non satisfaisant : $\geq 10^4$ | Région Piémont (D.D. n°. 780 du 18.11.2011) IFST (1997) |
| <i>Enterobacteriaceae</i> n = 5 c = 1 m = 10 ufc/g M = 100 ufc/g | Satisfaisant : <10 Acceptable : $10 \leq x < 10^2$ Non satisfaisant : $\geq 10^2$ | Rec. 2004/24/CE |
| <i>Escherichia coli</i> n = 5 c = 1 m = 10 ufc/g M = 100 ufc/g | Satisfaisant : <10 Acceptable : $10 \leq x < 10^2$ Non satisfaisant : $\geq 10^2$ | Rec. 2004/24/CE ESA 2004 |
| <i>Clostridium perfringens</i> n = 5 c = 1 m = 100 ufc/g M = 1000 ufc/g | Satisfaisant : $<10^2$ Acceptable : $10^2 < x < 10^3$ Non satisfaisant : $\geq 10^3$ | Rec. 2004/24/CE |
| <i>Bacillus cereus</i> n = 5 c = 1 m = 1000 ufc/g M = 10000 ufc/g | Satisfaisant : $<10^3$ Acceptable : $10^3 \leq x < 10^4$ Non satisfaisant : $\geq 10^4$ | Rec. 2004/24/CE |
| <i>Salmonella</i> spp. n = 5 c = 0 | Satisfaisant : absent en 25 g | Rec. 2004/24/CE |
| <i>Listeria monocytogenes</i> n = 5 c = 0 | Satisfaisant : ≤ 100 | Rég. 2073/05/CE |

m : valeur limite du nombre de bactéries ; le résultat est jugé satisfaisant si le nombre de bactéries dans toutes les unités d'échantillonnage analysées est inférieur à **m** ;

M : nombre maximal toléré de bactéries ; le résultat est considéré comme insatisfaisant si le nombre de bactéries dans une ou plusieurs unités d'échantillonnage analysées est supérieur à **M** ;

c : le nombre d'unités d'échantillonnage dont la valeur peut se situer entre **m** et **M** ; l'échantillon est toujours considéré comme acceptable si le nombre de bactéries dans les autres unités d'échantillonnage est inférieur ou égal à **m**.

[3]. RÉGLEMENTATION ET APPLICATIONS DE L'OZONE DANS LE DOMAINE ALIMENTAIRE

En ce qui concerne l'utilisation de l'ozone dans l'industrie alimentaire, en Italie, le Ministère de la Santé, par le protocole du 31 juillet 1996 n°. 24482, a reconnu l'utilisation de l'ozone dans le traitement de l'air et de l'eau, en tant que moyen naturel pour la stérilisation des environnements contaminés par des bactéries, des virus, des spores, des moisissures et des acariens. Comme l'ozone ne laisse pas de résidus, son utilisation est donc permise dans le respect des normes H.A.C.C.P. et du Décret législatif italien 626/94 en limitant les concentrations d'emploi. En fait, à des concentrations élevées, l'ozone peut causer des dommages aux voies respiratoires de l'opérateur en altérant la perméabilité des cellules épithéliales, avec une réduction conséquente de la fonction pulmonaire. Conformément aux normes H.A.C.C.P. et au Décret législatif italien 626/94, par conséquent, l'utilisateur ne doit donc pas être exposé à plus de 0,1 ppm d'ozone en 8 heures ou plus de 0,3 ppm deux fois par jour pendant 15 minutes.

L'utilisation de l'ozone comme outil de réduction de la charge microbienne dans les herbes aromatiques a fait l'objet de certaines études scientifiques résumées au tableau 3. Parmi les recherches les plus intéressantes, figure celle de Kazi et al. (2017) ayant utilisé de l'ozone (4 ppm pendant 30 et 60 min) sur l'origan et le thym séchés, ce qui a entraîné une diminution de la charge microbienne pour les bactéries, les levures et les moisissures, tandis que les spores étaient résistantes au traitement. L'origan séché a de nouveau été étudié par Torlak et al. (2013) qui ont évalué l'efficacité du traitement avec 2,8 et 5,3 ppm pendant 120 minutes pour contenir le développement de *Salmonella spp.* L'étude d'Akbas et al. (2008), menée non pas sur des herbes mais sur du piment rouge séché, s'est avérée tout aussi intéressante : on a démontré que l'ozone était efficace contre les cellules végétatives d'*E. coli* et de *B. cereus* à une concentration de 1 ppm pour un traitement de 360 min, tandis que des doses de 5 ppm étaient nécessaires pour les spores de *B. cereus*. Enfin, l'étude de Sengun et al. (2013) mérite une mention : l'ozone a été utilisé sous forme d'eau ozonisée et il est résulté actif à une concentration de 1,5 ppm pendant 5 min contre *S. typhimurium*.

Même si la bibliographie scientifique est encore assez faible, ces premières recherches fournissent un premier cadre des valeurs possibles de concentration et durée des traitements à partir desquelles on pourra entamer les essais expérimentaux décrits et prévus dans le WP3.

Tableau 3. Paramètres issus d'études scientifiques sur l'utilisation de l'ozone pour contenir la charge microbienne dans les herbes aromatiques et les épices.

| RÉFÉRENCE | MATRICE ALIMENTAIRE | OZONE GAZEUX | EAU OZONISÉE | CIBLE MICROBIENNE |
|-----------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------|--|
| Kazi, 2017 | Origan et thym séchés | 4 ppm pendant 30- 60 min | - | Bactéries Levures Moisissures |
| Torlak, 2013 | Origan séché | 2,8-5,3 ppm pendant 120 min | - | <i>Salmonella</i> spp. |
| Akbas, 2008 | Piment rouge séché | 1,0 ppm pendant 360 min | - | <i>E. coli</i> <i>B. cereus</i> |
| | | 5,0 ppm pendant 360 min | - | Spores de <i>B. cereus</i> |
| Sengun, 2013 | Persil | - | 1,5 ppm pendant 5 min | <i>S. typhimurium</i> |
| Brodowska, 2014 | Cardamome | 160-165 ppm pendant 30 min | - | Charge mésophile microbienne Champignons Entérobactéries |

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akbas M. et Ozdemir, M. (2008). Effect of gaseous ozone on microbial inactivation and sensory of flaked red peppers. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(9), 1657-1662.
- Brodowska J.A., Śmigielski K., Nowak A., Brodowska K., Catthoor R. et Czyżowska A. (2014). The Impact of ozone treatment on changes in biologically active substances of cardamom seeds. *Journal of Food Science*, 79(9), 1649-1655.
- Fogele B., Granta R., Valcina O., Bērziņš A., (2017). Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices et herbs. *Food Control*, in press.
- Garbowska M., Berthold-Pluta A., Stasiak-Róžańska, L. (2015). Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiology*, 49, 1-5.
- Kazi M., Parlapani F., Boziaris I., Vellios E. et Lykas C. (2017). Effect of ozone on the microbiological status of five dried aromatic plants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, DOI 10.1002/jsfa.8602.
- Sagoo S., Little C., Greenwood M., Mithani V., Grant K., Mclauchlin J., Depinna E., Threlfall E. (2009). Assessment of the microbiological safety of dried spices and herbs from production and retail premises in the United Kingdom. *Food Microbiology*, 26(1), 39-43.
- Sengun, I. (2013). Effects of ozone wash for inactivation of *S. typhimurium* and background microbiota on lettuce and parsley. *Journal of Food Safety*, 33(3), 273-281.
- Torlak E., Sert D. et Ulca, P. (2013). Efficacy of gaseous ozone against *Salmonella* and microbial population on dried oregano. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), 276-280.
- Vitullo M., Ripabelli G., Fanelli I., Tamburro M., Delfine S., Sammarco M. (2011). Microbiological and toxicological quality of dried herbs. *Letters in Applied Microbiology*, 52(6), 573-580.
- Wójcik-Stopczyńska B., Jakubowska B., Reichelt M., (2009). Microbiological contamination of dried culinary herbs. *Herba Polonica*, 55 (3), 207-213.