

Les bactéries pathogènes peuvent-elles survivre à la surface des légumes ?

THÉMATIQUE DE RECHERCHE :

Risque microbiologique
en santé animale
et santé humaine

*La consommation de fruits et légumes crus est reconnue comme très positive pour la santé. Néanmoins, ils sont aussi à l'origine de la transmission de plusieurs maladies bactériennes d'origine alimentaire, et causent des épidémies dans diverses parties du monde. Plusieurs équipes de recherche de l'Inra ont collaboré pour comprendre comment *Listeria monocytogenes*, une bactérie pathogène transmise par les aliments, pouvait survivre à la surface de végétaux et les conséquences à en tirer pour garantir la sécurité des fruits et légumes crus.*

CONTEXTE

Il n'existe pas de moyen efficace qui permette d'éliminer des bactéries présentes à la surface des végétaux que l'on souhaite consommer crus. Par conséquent, il est absolument nécessaire d'éviter que des bactéries dangereuses pour le consommateur ne se retrouvent, au moment de la récolte, à la surface des fruits et légumes destinés à être consommés crus.

Au cours de leur production, les fruits et légumes peuvent être contaminés par des bactéries pathogènes de l'homme, à la suite d'évènements indépendants des activités humaines comme la présence d'animaux sauvages, mais le plus souvent suite à l'épandage de fumure organique ou l'utilisation d'eau d'irrigation de qualité inadéquate.

Les bactéries pathogènes qui ont été transmises par des fruits et légumes crus appartiennent principalement aux espèces *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* (sérovar pathogène) et *Listeria monocytogenes*. Ces bactéries sont très rarement présentes sur les végétaux et dans l'environnement des cultures légumières ou fruitières, mais *L. monocytogenes* est néanmoins régulièrement détectée, avec une faible fréquence, dans les végétaux, l'eau et des fumures utilisées en agriculture. Il n'est donc pas facile de garantir l'absence de *L. monocytogenes* des fruits ou légumes.

DÉMARCHE DE RECHERCHE

La survie de *L. monocytogenes* a été étudiée 1) dans le sol de culture en simulant une contamination du champ par l'épandage d'une fumure et 2) à la surface des feuilles en simulant une contamination directe de celles-ci par l'irrigation, ou indirecte par des éclaboussures de particules de sol.

Les travaux ont associé des essais en laboratoire permettant d'étudier les mécanismes impliqués dans la survie de la bactérie, avec des essais en plein champ destinés à mesurer cette survie dans des conditions réelles de culture. En plein champ, *L. innocua*, une espèce proche non pathogène, a été utilisée pour éviter d'introduire une bactérie pathogène dans l'environnement. L'utilisation de *L. innocua* comme modèle de *L. monocytogenes* a été validé en laboratoire. Le persil a été utilisé pour l'ensemble de nos travaux. ➔

➔ ÉTAT DES CONNAISSANCES

L. monocytogenes n'est pas capable de s'implanter dans le sol mais peut y persister plusieurs semaines, et survit mieux en période froide et humide comme l'hiver. En outre, une faible population de *L. monocytogenes* dans le sol (de l'ordre de 10 *Listeria* viables par gramme de sol) suffit à permettre sa présence sur les feuilles de la plante. Le transfert du sol vers les parties aériennes de la plante semble surtout se produire par l'intermédiaire des éclaboussures de particules de sol. Les cellules de *Listeria* présentes dans le sol semblent peu disséminées par voie aérienne (aérosols). Enfin, *L. monocytogenes* n'est pas capable de "voyager" dans la plante à partir de son système racinaire, comme peuvent le faire d'autres espèces bactériennes.

L. monocytogenes semble mourir très rapidement lorsqu'elle se retrouve à la surface des feuilles. Sa survie est divisée par au moins 10 000 après une journée, par un temps sec et en plein champ. Elle peut néanmoins être notablement améliorée au contact de substances qui peuvent être présentes dans les tissus végétaux et excrétées par d'autres espèces bactériennes comme la glycine-bétaine. Une activation de son système général de réponse au stress, avant que la bactérie se soit déposée sur les feuilles, réduit aussi sa mortalité.

Cultiver la plante sous un abri propre à maintenir une humidité plus élevée améliore la survie de *L. monocytogenes* à la surface des feuilles. Lorsque l'humidité de l'air ambiant approche la saturation, *L. monocytogenes*, non seulement survit, mais se multiplie à la surface des feuilles. La présence de quelques bactéries survivantes à la récolte pourrait donc conduire à des populations importantes si le produit est conservé quelques jours sous forte humidité (sous un emballage, par exemple).

L. monocytogenes est détectée et dénombrée sur les feuilles à l'aide de milieux de cultures. Néanmoins, alors que plus aucune *Listeria* n'est détectée sur ces milieux, nous avons montré que les cellules de la bactérie sont toujours visibles au microscope. Il est aussi possible de démontrer que ces cellules bactériennes sont toujours capables de respirer et de grandir, même si elles ne peuvent plus se multiplier dans les milieux de cultures utilisés.

La "mort" des *L. monocytogenes* déposées sur les feuilles et exposées à un air sec n'est donc peut être qu'apparente. En outre, lors de la recherche de *L. monocytogenes* sur des végétaux crus, il est possible que des cellules de *Listeria* encore vivantes ne soient pas détectées. Néanmoins, ces cellules de *Listeria* qui ont perdu la capacité de se multiplier après avoir été exposées à des conditions défavorables (faible humidité de l'air) ne peuvent la récupérer lorsque les conditions redeviennent favorables (humidité saturante de l'air ambiant). Leur population ne pourra donc plus augmenter lors de la conservation du produit.

Une bactérie pathogène comme *L. monocytogenes* ne semble pas capable de persister au delà de quelques jours à la surface d'une plante en culture. Néanmoins, elle peut survivre plusieurs semaines dans le sol et de là contaminer aisément les parties aériennes. En outre, plusieurs facteurs liés à la physiologie de la bactérie peuvent modifier ses capacités de survie, introduisant une incertitude sur la durée de persistance de *L. monocytogenes* dans les conditions réelles de production.

PERSPECTIVES, IMPACT À TERME

Les résultats sont utilisés par la profession pour l'élaboration de bonnes pratiques agricoles destinées à réduire le risque de contamination des végétaux par *L. monocytogenes* et par l'industrie pour évaluer l'impact des options de gestion des risques.

Survival of pathogenic bacteria on the surface of vegetables

RESEARCH AREA:

Microbiological risks
in animal and public health

*The intake of raw fruits and vegetables is widely recognised to be very healthy. However, fruits and vegetables are behind the transmission of several food-borne bacterial diseases, and cause epidemics in different parts of the world. Several INRA research teams have worked together to understand how *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogenic bacteria, can survive on plant surfaces and what conclusions can be drawn to ensure the safety of uncooked fruits and vegetables.*

BACKGROUND

There are no efficient ways of eliminating the bacteria found on the surface of plants that are consumed raw. As a result, during harvest, bacteria that pose a threat to consumers must be prevented from remaining on the surface of fruits and vegetables that are ingested uncooked.

As they are produced, fruits and vegetables may be contaminated by human pathogenic bacteria as a result of events that are independent of human activity, such as the presence of wild animals, or, as is often the case, following the application of organic fertiliser or the use of low-quality irrigation water.

Pathogenic bacteria transmitted by raw fruits and vegetables belong mainly to the species *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* (serovar pathogens) and *Listeria monocytogenes*. These bacteria are very rarely present on plants and in the environment of cultivated fruits or vegetables, but *L. monocytogenes* is nevertheless regularly detected, albeit infrequently, in plants, water and fertiliser used in agriculture. Consequently it is difficult to guarantee the absence of *L. monocytogenes* in fruits and vegetables.

RESEARCH APPROACH

The survival of *L. monocytogenes* was studied 1) in the cultivated soil, simulating the contamination of a field following fertilisation and 2) on the surface of leaves, simulating their direct (through irrigation) or indirect (spattering of soil particles) contamination.

The work combined laboratory trials to analyse the mechanisms involved in bacterial survival with field trials aimed at measuring this survival in actual cultivation conditions. In the field, *L. innocua*, a closely-related non-pathogenic species, was used to avoid the introduction of pathogenic bacteria into the environment. The validity of *L. innocua* as a model for *L. monocytogenes* was confirmed in the laboratory. Parsley was used throughout the research work. ➔

➤ STATE OF THE ART

L. monocytogenes is not capable of establishing itself in the soil, but can remain there for several weeks. It survives better in cold and wet conditions, like in winter. Moreover, a low *L. monocytogenes* population in the soil (around 10 viable *Listeria* per gram of soil) is enough to allow its presence on plant leaves. Transfer from soil to the plant's aerial parts seems to occur mainly through the spattering of soil particles. Cells from soil *Listeria* appear to be rarely disseminated by air (aerosols). Finally, *L. monocytogenes* cannot "travel" in the plant through its root system, unlike certain species of bacteria.

L. monocytogenes appears to die very quickly when it is found on leaf surfaces. Its survival decreases by at least 10,000 after one day outdoors in dry weather. However, survival can be markedly improved upon contact with substances that may be present in plant tissue and excreted by other bacteria species, such as glycine-betaine. Activation of the bacteria's general stress response, before it settles on leaves, also decreases its mortality.

Cultivating plants under shelters that maintain higher levels of humidity also improves the survival of *L. monocytogenes* on leaf surfaces. When the humidity of ambient air is close to saturation point, *L. monocytogenes* not only survives, but actually multiplies on leaf surfaces. The presence of surviving bacteria at harvest time can then lead to large bacterial populations if the product is stored in highly humid conditions for several days (in packaging, for example).

L. monocytogenes is detected and counted on leaves with the help of culture media. Nonetheless, although no *Listeria* is detected any longer on the media, we have shown that bacterial cells are still visible under the microscope. It is also possible to demonstrate that these bacterial cells are still able to breathe and grow, even though they can no longer multiply in the culture media used.

L. monocytogenes on leaves and exposed to dry air may thus only appear to be "dead". Moreover, during research on *L. monocytogenes* on raw plants, it is possible that *Listeria* cells may not have been detected. However, *Listeria* cells that have lost their capacity to multiply following exposure to unfavourable conditions (low air humidity) can only regain it when conditions are favourable once again (near-saturation of ambient air). Their population can therefore no longer increase during product storage.

A pathogenic bacteria like *L. monocytogenes* does not seem to be capable of remaining for more than a few days on the surface of a cultivated plant. However, it can survive for several weeks in the ground and contaminate aerial parts from there. In addition, several factors related to the bacteria's physiology can change its survival abilities, injecting some uncertainty on how long *L. monocytogenes* persists under actual conditions of production.

PROSPECTS, FUTURE IMPACT

These results are used by the profession to draft good agricultural practices that are aimed at reducing the risk of plant contamination by *L. monocytogenes* and by the industry to assess the impact of risk management options.