UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

PAUL MICHEL

EFFETS DES COMPOSÉS VOLATILS GÉNÉRÉS PAR IRRADIATION DU POLYÉTHYLÈNE SUR UNE FLORE MICROBIENNE ALIMENTAIRE

FÉVRIER 1996

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES II
LISTE DES ABRÉVIATIONS V
LISTE DES TABLEAUX VII
LISTE DES FIGURES IX
SOMMAIRE XI
INTRODUCTION 1
REVUE DE LA LITTÉRATURE 4

1.0 LA TECHNOLOGIE DE L'EMBALLAGE ALIMENTAIRE 5

1.1 Historique 5
1.2 Fonctions de l'emballage 5
1.3 Emballages alimentaires plastiques 6
1.3.1 Propriétés physiques 6
1.3.2 Propriétés chimiques 9
1.3.3 Propriétés mécaniques 10

2.0 L'IRRADIATION 12

2.1 Définition 12
2.2 Principes de la radiation ionisante 12
2.2.1 Classes de radiation ionisante 12
2.2.2 Mécanismes d'action 14
2.2.2.1 Action directe 14
2.2.2.2 Action indirecte 17
2.2.3 Rayons gamma vs rayons bêta 20
2.2.3.1 Débit de la dose d'irradiation 20
2.2.3.2 Pouvoir pénétrant 21
2.3 Irradiation du matériel biologique 21
2.3.1 Principe d'inactivation 21
2.3.2 Radiorésistance 22
2.3.2.1 Facteurs intrinsèques 22
2.3.2.2 Facteurs extrinsèques 25
2.3.3 Évaluation de la radiosensibilité microbienne 27
2.3.4 Formation de mutants 29
2.3.5 Souches microbiennes étudiées 30
2.3.5.1 *Pseudomonas fragi* 30
2.3.5.2 *Aspergillus flavus* 32
2.3.5.3 *Candida albicans* 34
2.4 Irradiation des emballages plastiques 35
2.4.1 Changements fondamentaux 36
2.4.2 Facteurs intrinsèques et extrinsèques 38
2.4.3 Propriétés physiques et mécaniques 39
2.4.4 Propriétés chimiques 41
2.4.4.1 Modifications chimiques internes 41
2.4.4.2 Migration 42
2.4.4.3 Produits de radiolyse volatils 43
2.4.5 Polymères résistants à l'irradiation 46

3.0 COMPOSÉS CHIMIQUES ACTIFS SUR LES MICROORGANISMES 49

3.1 Évaluation de l'action de composés chimiques sur les microorganismes 49
3.1.1 Libération de composés chimiques liquides absorbés dans un support solide. 49
3.1.2 Addition directe de composés chimiques à un milieu de culture. 50
3.1.3 Conditionnement d'un milieu de culture à l'aide de gaz et de composés volatils. 50
3.2 Action des gaz 52
3.3 Action des composés organiques volatils de faible poids moléculaire 53
3.3.1 Aldéhydes 53
3.3.2 Cétones 55
3.3.3 Alcools 55
3.3.4 Hydrocarbures 57
3.3.5 Acides 58

MATÉRIEL ET MÉTHODES 63

1.0 ANALYSE DES COMPOSÉS VOLATILS DU PEBD 64

1.1 Préparation des échantillons 64
1.2 Irradiation 64
1.3 Récupération et concentration des composés volatils 66
1.4 Chromatographie 66
1.4.1 GC-MS 66
1.4.2 GC-FID 68

2.0 ANALYSE DES MICROORGANISMES IRRADIÉS EN PRÉSENCE DU PEBD 69

2.1 Essais préliminaires 69
2.2 Définition des modèles d'étude et des traitements 70
2.2.1 Modèles d'étude 70
2.2.2 Traitements 72
2.3 Préparation du matériel 73
2.3.1 Boîtes de Petri 73
2.3.2 Emballage plastique 73
2.4 Incubation des souches microbiennes 74
2.4.1 *Pseudomomas fragi* 74
2.4.2 *Candida albicans* 75
2.4.3 *Aspergillus flavus* 75
2.5 Choix des doses d'irradiation 78
2.6 Dilutions et inoculations sur boîtes de Petri . 78
2.7 Irradiation 81
2.7.1 Modèle d'étude 1 81
2.7.2 Modèle d'étude 2 81
2.8 Incubation 82
2.9 Tests biochimiques et évaluation visuelle . . . 82
2.10 Analyse statistique 84

RÉSULTATS 87

1.0 ANALYSE DES COMPOSÉS VOLATILS GÉNÉRÉS PAR LE PEBD 88
1.1 Analyse chromatographique 88
1.1.1 Analyse qualitative par GC-MS 88
1.1.2 Analyse qualitative par GC-FID 88

2.0 ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE L'EFFET DES COMPOSÉS VOLATILS DU PEBD 97

2.1 Effet sur la survie à l'irradiation 97
2.2 Effet sur l'activité biochimique 98
2.3 Toxicité des milieux de culture irradiés 100

DISCUSSION 102

1.0 IDENTIFICATION DES COMPOSÉS VOLATILS DU PEBD . . . 103

1.1 Relation avec la dose d'irradiation 103
1.2 Relation avec l'âge du polyéthylène 105

2.0 EFFET MICROBIOLOGIQUE DES COMPOSÉS VOLATILS DU PEBD 107

2.1 Effet sur la radiorésistance microbienne 107
2.1.1 Influence de la radiorésistance intrinsèque . 107
2.1.2 Influence de la composition du mélange volatil 108
2.1.2.1 Aldéhydes 108
2.1.2.2 Cétones 109
2.1.2.3 Alcanes et alcènes 110
2.1.2.4 Dérivés benzéniques 111
2.1.2.5 Alcools 113
2.1.2.6 Effets d'addition, de potentialisation et de synergie 113
2.1.2.7 Effet antagoniste 114
2.1.3 Influence de la concentration des composés volatils 115
2.1.4 Influence liée à la production de gaz dans l'atmosphère interne de l'emballage 115
2.2 Effet sur l'activité enzymatique et les caractères physiques des microorganismes 116

CONCLUSION 118
REMERCIEMENTS 121
BIBLIOGRAPHIE 124
ANNEXE 136

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aw	:	Activité de l'eau libre / reliée à l'humidité relative de l'aliment.
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
cc	:	centimètre-cube
CE	:	Communauté européenne
^{60}Co	:	Isotope radioactif du cobalt (masse atomique de 60).
CP	:	Coefficient de partage
dm	:	décimètre
EVOH	:	Éthylène-alcool vinylique
g	:	gramme
G	:	Force gravitationnelle
GC-MS	:	Chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse
GC-FID	:	Chromatographe en phase gazeuse couplé à un détecteur d'ionisation à flamme.
Gy	:	Gray. Unité d'énergie absorbée par la matière traitée aux radiations ionisantes. 1 Gy = absorption d'un (1) joule par kilogramme de matière traitée.
h	:	heure
IR	:	Infra-rouge
kGy	:	kiloGray
MC	:	Marque de commerce
mg	:	milligramme
ml	:	millilitre
mV	:	millivolt
nm	:	nanomètre

PE	:	Polyéthylène
PEBD	:	Polyéthylène de basse densité
PEHD	:	Polyéthylène de haute densité
PEMD	:	Polyéthylène de moyenne densité
PET	:	Polyéthylène téréphtalate
PVC	:	Poly(chlorure de vinyle)
PVDC	:	Poly(chlorure de vinylidène)
PP	:	Polypropylène
PS	:	Polystyrène
rpm	:	Rotation par minute
RSE	:	Spectroscopie de résonnance de spin d'électron
UFC	:	Unités formatrices de colonies
UFT	:	Unités formatrices de thalles

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Types de radiations ionisantes 13

Tableau 2 : Doses recommandées pour inactiver le matériel biologique. 23

Tableau 3 : Composés volatils générés par irradiation d'emballages plastiques. 44

Tableau 4 : Emballages approuvés par le "Food and Drug Administration" pour l'irradiation alimentaire. 47

Tableau 5 : Liste de composés chimiques actifs sur les microorganismes. 60

Tableau 6 : Composés volatils générés par le PEBD de 1 an irradié à 0, 0,25 et 5 kGy accompagnés de leur temps de rétention et de leur coefficient de corrélation obtenus par GC-MS 91

Tableau 7 : Composés volatils générés par le PEBD de 10 ans irradié à 0, 0,25 et 5 kGy accompagnés de leur temps de rétention et de leur coefficient de corrélation obtenus par GC-MS. 92

Tableau 8 : Abondance, par groupe chimique, des composés volatils générés par le PEBD de 1 an et de 10 ans irradiés à 0, 0,25 et 5 kGy (GC-MS). 94

Tableau 9 : Identification des composés volatils générés par le PEBD de 1 an irradié à 0 et 5 kGy (GC-FID). 96

Tableau 10 : Survie à l'irradiation de *Pseudomonas fragi*, *Candida albicans* et *Aspergillus flavus* en présence ou absence de PEBD. 99

Tableau 11 : Mutations sur tests biochimiques de *Pseudomonas fragi* et *Candida albicans* irradiés et exposés aux composés volatils générés par le PEBD. 101

Tableau 12 : **Effet de l'irradiation du milieu de culture (BHI) sur la croissance de *Pseudomonas fragi*, *Aspergillus flavus* et *Candida albicans*.** 101

Tableau 13 : **Liste des standards externes chromatographiés par GC-FID.** 137

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Effet Compton 15

Figure 2 : Interactions avec la matière 16

Figure 3 : Formation d'ions et de radicaux libres . . . 18

Figure 4 : Courbe de survie théorique: relation entre la dose et le logarithme du nombre de microorganismes survivant à l'irradiation. 28

Figure 5 : Réticulation, dégradation et action de l'oxygène lors de l'irradiation du polyéthylène 37

Figure 6 : Montage employé pour la production des composés volatils provenant du plastique irradié. 65

Figure 7 : Système d'analyse de composés volatils par sorption/désorption ("Purge and Trap"). 65

Figure 8 : Modèle d'étude 1 : Sachet de PEBD 71

Figure 9 : Modèle d'étude 2: Cylindre d'acier inoxydable contenant le PEBD 71

Figure 10 : Démarrage des cultures *Pseudomonas fragi* et *Candida albicans* 76

Figure 11 : Démarrage de la culture d'*Aspergillus flavus* 79

Figure 12 : Application des tests biochimiques pour *Pseudomonas fragi* et *Candida albicans* 85

Figure 13 : Chromatographie (GC-MS) des composés volatils générés par le PEBD de 1 an irradié à 0, 0,25 et 5 kGy 89

Figure 14 : Chromatographie (GC-MS) des composés volatils générés par le PEBD de 10 ans irradié à 0, 0,25 et 5 kGy. 90

Figure 15 : **Visualisation, par groupe chimique, de l'abondance des composés volatils générés par le PEBD de 1 an et de 10 ans irradiés à 0, 0,25 et 5 kGy (GC-MS).** 93

Figure 16 : **Chromatographie (GC-FID) des composés volatils générés par le PEBD de 1 an irradié à 0, 0,25, 1 et 5 kGy.** 95

Figure 17 : **Courbes isodoses GAMMACELL 220** 138

SOMMAIRE

Pseudomonas fragi, *Candida albicans* et *Aspergillus flavus* ont été exposés aux composés volatils générés par un polyéthylène de basse densité (PEBD) de grade alimentaire lors d'une irradiation gamma (^{60}Co) à 0,25, 0,5 et 2,0 kGy respectivement. Seul le taux de survie à l'irradiation de *Pseudomonas fragi* était différent après une exposition aux composés volatils. Lorsqu'un film de PEBD de fabrication récente (1 an) était employé, le taux de survie de ce microorganisme était plus faible en présence des composés volatils (effet significatif au seuil de $\alpha = 0,05$). En utilisant un PEBD de fabrication de longue date (10 ans), le taux de survie était plus grand en présence des composés volatils (effet significatif au seuil de $\alpha = 0,05$). L'effet des composés volatils n'était pas modifié par une augmentation de la quantité de PEBD de 2 à 20 cm^2/ml d'air.

L'activité biochimique de *Pseudomonas fragi* et *Candida albicans* a été vérifiée et ne semblait pas être affectée de façon importante par la présence des composés volatils générés à 0,25 et 2 kGy respectivement. L'apparence sur gélose d'*Aspergillus flavus* ne semblait pas être touchée par les composés volatils produits à 0,5 kGy.

L'analyse des composés volatils a été complétée par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse. Le profil des composés volatils du PEBD variait avec l'âge du

matériau. À la dose d'irradiation de *Pseudomonas fragi* (0,25 kGy), la majeure partie de ces composés ont été identifiés comme étant des aldéhydes aliphatiques (hexanal, heptanal, octanal, nonanal et decanal). Des différences majeures ont été notées entre les PEBDs de 1 et 10 ans. Le PEBD de 1 an produisait un benzène substitué (1,3-di(*tert*-butyl)-benzène) en concentration relativement importante. Le PEBD de 10 ans générait plusieurs cétones (6-méthyl-5-heptène-2-one, 2-nonanone, 2-decanone et 1,7,7-trimethyl-bicyclo(2.2.1)-heptane-2-one) ainsi que deux alcools (1-heptanol et 1-octanol). Ces différences entre les deux plastiques pourraient être responsables des effets contraires observés sur le taux de survie à l'irradiation de *Pseudomonas fragi* et mériteraient d'être étudiées plus à fond.

INTRODUCTION

L'utilisation de la matière plastique dans la fabrication d'emballage alimentaire est aujourd'hui devenue une pratique courante. Ce matériel a acquis une part importante du marché dans le secteur de l'agroalimentaire grâce à ces propriétés avantageuses (transparence, légèreté, perméabilité sélective, etc.).

L'irradiation des aliments est appliquée sur des produits pré-emballés afin d'éviter une recontamination microbienne. D'autre part, il est reconnu que l'irradiation peut affecter les propriétés physiques et chimiques des matériaux. De nombreuses études sur le comportement des matériaux plastiques vis-à-vis l'irradiation ont permis d'identifier plusieurs polymères stables. Toutefois certains d'entre-eux, comme le polyéthylène qui est le polymère le plus utilisé dans l'industrie agroalimentaire, émettent des composés volatils odorants de faible concentration pouvant demeurer dans l'atmosphère à l'intérieur de l'emballage. Plusieurs de ces composés affichent des potentiels d'inhibition, de stimulation ou de radioprotection microbienne. Il est donc possible que des répercussions sur la survie de microorganismes irradiés surviennent lorsqu'exposés à ces composés volatils. L'inexistence d'étude traitant de l'effet de ces composés volatils sur la flore microbienne alimentaire et par le fait même sur la conservation des aliments, nous a incités à réaliser cette étude.

Une identification de plusieurs composés volatils générés par des films de polyéthylène de basse densité a été complétée ainsi que l'étude de l'effet de l'ensemble de ces composés sur 3 microorganismes de la flore de dégradation des aliments.

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.0 LA TECHNOLOGIE DE L'EMBALLAGE ALIMENTAIRE

1.1 Historique

Ce furent les Chinois qui, il y a déjà plusieurs millénaires, utilisèrent les premiers des emballages adaptés à différents types d'aliments. L'ère de la mise en conserve (appertisation) ne date que du début des années 1800. L'emballage relié à ce type de conservation se résumait à une boîte de conserve étanche, lourde et souvent difficile à ouvrir. Toutefois, ce type d'emballage répondait aux exigences de l'époque: garder les aliments propres, faciliter le transport et être une barrière contre les parasites (Bureau, 1989).

Aujourd'hui une plus grande variété de matériaux d'emballage sont disponibles pour le commerce des aliments tels: le papier, le verre, le métal, le coton, le jute et le plastique. Les débuts du plastique dans le domaine de l'emballage sont toutefois plus récents et datent de la deuxième guerre mondiale (Brown, 1992). A cette époque, la recherche et le développement par l'industrie chimique et pétrochimique étaient axés sur la production de nouveaux polymères offrant de nouvelles possibilités.

1.2 Fonctions de l'emballage

Un emballage alimentaire exerce habituellement trois fonctions précises. Il doit assurer principalement la fonction de contenant, c'est-à-dire identifier son contenu, d'en

indiquer le poids ou son volume, permettre son entreposage, sa manutention et un transport efficace. Il doit aussi assumer une fonction de protection de la qualité en protégeant l'apparence du produit contre toute action mécanique reçue après sa fabrication. L'emballage doit également protéger les denrées alimentaires de tout corps étranger inerte ou toxique, d'insecte et de vermine. Finalement, sa fonction de conservation est primordiale pour que la stabilité chimique et microbiologique de l'aliment, souvent modifiée par les procédés de transformation et les conditions environnementales (air, humidité et lumière), soit maintenue jusqu'à sa consommation.

1.3 Emballages alimentaires plastiques

Un grand choix de matériaux d'emballage est offert aux fabricants de produits alimentaires. Cependant, ce choix est graduellement axé sur la matière plastique en raison de son faible coût et de ses propriétés adaptées à différentes applications alimentaires. Les plastiques possèdent des propriétés chimiques et physiques qui en font un matériau d'emballage très versatile.

1.3.1 Propriétés physiques

Densité

La densité est la propriété responsable de la plupart des attributs du plastique. Une densité élevée du plastique contribue à la dureté et la force du matériel qui sont des

propriétés mécaniques très recherchées. Une baisse de la densité rend le plastique plus poreux et perméable (Jenkins et Harrington, 1991). La densité du plastique pour des usages alimentaires est en général plus faible (0,9 à 1,4 g/cc) que les autre types de matériaux (verre 2,6, aluminium 2,7, métal 8) sauf pour le papier (papier 0,8 à 0,9), ce qui permet d'offrir des produits d'emballages consommant moins de matières premières. Cette caractéristique entraîne donc de faibles coûts de production et de transport. L'augmentation de la densité permet également la réduction de l'absorption d'ingrédients alimentaires dans la paroi de l'emballage et peut stopper les pertes ou les infiltrations de gaz à travers un film d'emballage (Jenkins et Harrington, 1991).

Solubilité

L'absorption d'eau par les polymères (hydrosolubilité) est une propriété non-négligeable chez certains types d'emballages. Même si ce mécanisme est faible, il est parfois nécessaire afin d'améliorer l'imperméabilité à certains gaz. C'est le cas de l'emballage employé pour conserver la viande fraîche (Brown, 1992). La solubilité aux gaz est aussi une propriété importante pour contrôler la perméabilité des emballages plastiques. Elle favorise ou réduit, selon la nature du polymère, leur transfert de masse à travers le film d'emballage (Jenkins et Harrington, 1991).

Perméabilité

La perméabilité est une propriété associée, comme il a été mentionné précédemment, à la solubilité des gaz dans le polymère mais aussi au nombre de micro-perforations dans le réseau polymérique. La littérature fait mention habituellement de trois types de perméabilité soit: à la vapeur d'eau, à l'oxygène et au dioxyde de carbone (de Leiris, 1989, Jenkins et Harrington, 1991 et Brown, 1992). Ces trois éléments sont à la base de la conservation des aliments et sont responsables des activités de dégradation de nature: chimique (oxydation, brunissement non-enzymatique), enzymatique (sénescence) et microbiologique (putréfaction). Les taux de transmission atmosphérique de ces trois gaz sont contrôlés par les paramètres de production de chaque polymère. Par exemple, l'ajout de certains composés comme l'ion chlorure améliore l'imperméabilité à la vapeur d'eau (Osborn et Jenkins, 1991).

Fusibilité

La fusion du polymère plastique à des températures relativement basses permet le scellage des emballages de façon rapide et peu coûteuse. Les caractéristiques associées à ce type de scellage sont sa force et la vitesse à laquelle il devient efficace. Elles sont reliées au point de fusion de la forme cristalline du polymère qui présente une zone de températures de fusions entre 90 et 200°C selon le type de polymère employé.

Transparence et opacité

La transparence et l'opacité sont deux propriétés pouvant être obtenues selon le type polymère ou le procédé de production du matériel plastique. La transparence, lorsqu'elle est désirée, permet au consommateur une bonne vision du produit. Si par contre le produit doit éviter la lumière (sous peine d'oxydation), le changement de polymère ou l'addition de pigments est possible pour augmenter l'opacité du plastique.

1.3.2 Propriétés chimiques

Les emballages de contact alimentaire possèdent une inertie chimique face à la majorité des composés retrouvés dans les aliments. Toutefois, certaines substances peuvent être échangées entre l'aliment et le plastique.

Sorbtion

Les arômes et les saveurs des aliments sont parmi les composés les plus souvent absorbés par le polymère, ce qui cause des modifications organoleptiques au produit alimentaire. Les corps gras provenant des aliments sont aussi absorbés par le polymère ce qui provoque plusieurs méfaits: la déstabilisation d'émulsions alimentaires, le ramollissement, le gonflement et le craquement de l'emballage (Brown, 1992).

Migration

Plusieurs composés de faibles poids moléculaires provenant d'emballages plastiques peuvent migrer dans les aliments. Il s'agit habituellement d'additifs et de monomères résiduels provenant de la synthèse du polymère (Fritsch, 1989). L'évaluation de la migration est effectuée dans le but d'établir quelle est la toxicité résultante des aliments emballés. Elle peut être complétée selon deux approches: soit la migration globale ou la migration spécifique. La détermination de la migration globale, où la totalité des substances pouvant migrées est mesurée, elle s'effectue par des extractions à l'aide de simulateurs alimentaires comme l'eau, une solution d'acide acétique 3% en remplacement des aliments acides (pH < 5.0), une solution de 8% ou 50% d'alcool pour les boissons alcoolisées et l'heptane (ou huile végétale) pour les aliments gras (Pillette, 1990). La quantité de substances étrangères dans les simulants alimentaires est alors rapportée en terme de poids. La migration spécifique est quant à elle obtenue par l'analyse détaillée des composés contenus dans les simulants à l'aide de techniques analytiques appropriées (chromatographie en phase liquide et gazeuse, spectroscopie infra-rouge etc.).

1.3.3 Propriétés mécaniques

Directement reliées à la densité et à la morphologie, les propriétés mécaniques varient selon la nature du polymère. Le

choix du polymère se fait en tenant compte des applications désirées et du type d'aliment emballé.

Voici les principales propriétés recherchées pour la protection d'un aliment (Osborn et Jenkins, 1991).

- *Résistance à l'étirement*
- *Résistance aux impacts*
- *Résistance au pliage*
- *Rigidité*
- *Extensibilité des films*
- *Résistance à la rupture*

Les propriétés mécaniques des emballages plastiques sont les caractéristiques les plus fréquemment mesurées afin de détecter quels sont les effets causés par la modification d'un procédé de production, par le vieillissement du plastique ou par des traitements de conservation alimentaire.

2.0 L'IRRADIATION

2.1 Définition

L'irradiation est une technologie existant depuis maintenant une quarantaine d'années. D'utilisation simple, elle se résume à une exposition à une source de radiation ionisante, sous forme d'ondes courtes ou de particules de haute énergie, provoquant des changements d'ordre électronique chez plusieurs substances chimiques, sans élévation de chaleur du produit irradié. L'irradiation est couramment appliquée dans plusieurs secteurs de l'industrie comme: l'industrie pharmaceutique et médicale, l'industrie du plastique ainsi que l'industrie agroalimentaire. Dans ce dernier secteur, l'irradiation est employée pour réduire ou détruire complètement les micro-organismes, les parasites et les insectes indésirables dans les aliments. Elle est aussi utilisée pour ralentir certaines réactions post-récoltes de produits végétaux (mûrissement, sénescence et germination) et stériliser les emballages alimentaires.

2.2 Principes de la radiation ionisante

2.2.1 Classes de radiation ionisante

La radiation ionisante employée pour traiter les denrées alimentaires existe sous plusieurs formes et s'applique selon différentes techniques. Elles sont présentées au tableau 1.

Tableau 1 : **Types de radiations ionisantes**

Classe générale	Sous-classe	Technique / Source
Rayonnement électromagnétique (Photons)	Rayons gamma	Rayons générés par le ^{60}Co
		Rayons générés par le ^{137}Cs
	Rayons X	Rayons générés par le bombardement d'une cible métallique par des électrons.
Rayonnement particulaire (Électrons)	Rayons bêta	Faisceau d'électrons accélérés

(Urbain, 1986)

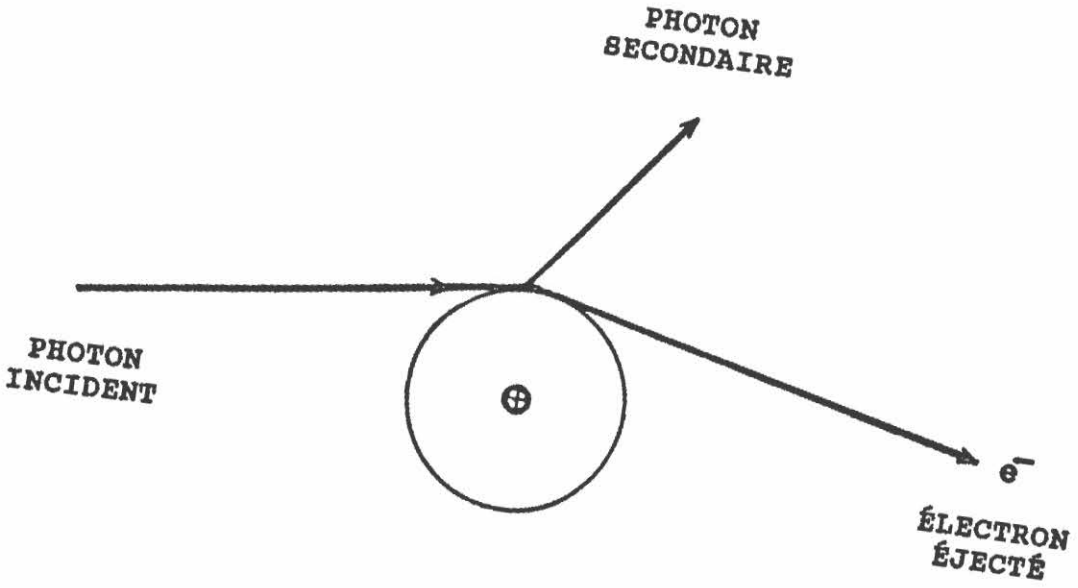
2.2.2 Mécanismes d'action

2.2.2.1 Action directe

Les deux techniques de rayonnement ionisant les plus largement employées comme procédé de conservation alimentaire et régulièrement citées dans la littérature sont les rayons gamma et bêta. Leur mécanisme d'action est pratiquement le même. Les photons (rayons gamma) et les électrons accélérés (rayons bêta) entrent en collision aléatoirement avec les électrons de molécules chimiques. L'énergie maximale des rayons gamma et des rayons bêta est respectivement de 1.33 MeV et de 5 MeV, cette dernière valeur étant le maximum fixé pour des usages alimentaires. La transmission d'une partie de leur énergie a lieu par éjection (ionisation) ou excitation des électrons des orbitales électroniques des atomes. Le mécanisme principal de transfert selon lequel les rayons gamma éjectent les électrons est connu sous le nom d'effet Compton (figure 1) (Brynjolfsson et Wang, 1982 et Urbain, 1986).

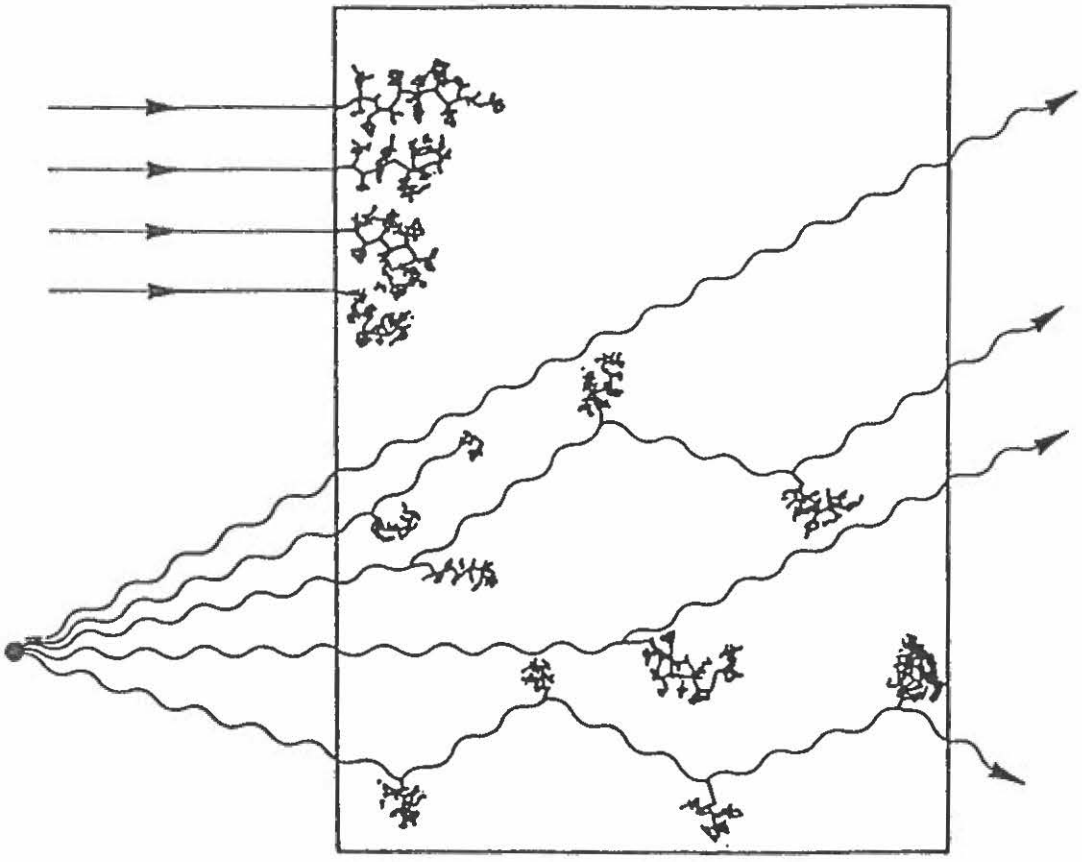
Propulsés par les photons (effet Compton) et les électrons accélérés, les électrons dits secondaires vont à leur tour transférer leur énergie cinétique à d'autres électrons à la manière d'une réaction en chaîne jusqu'à l'extinction de leur énergie. Contrairement aux électrons accélérés, les photons poursuivent leur course et peuvent franchir la totalité de l'épaisseur d'une substance de faible densité comme les aliments (figure 2).

Figure 1 : Effet Compton



(Urbain, 1986)

Figure 2 : **Interactions avec la matière**



Trajet des photons (X ou γ)

Trajet des électrons (accélérés ou primaires)

Trajet des électrons secondaires

(Vasseur, 1991)

L'action de la radiation ionisante est proportionnelle à la dose d'irradiation administrée, à l'épaisseur et la densité du matériel traité (Brynjolfsson et Wang, 1982).

2.2.2.2 Action indirecte

L'action indirecte de l'irradiation provient majoritairement de la production de radicaux libres et d'électrons célibataires aqueux mais très peu des ions (figure 3). Les radicaux libres, étant pourvus d'électrons célibataires, sont très réactifs. Ils ont tendance à se recombiner rapidement et à former de nouveaux composés, les produits de radiolyse. La réactivité des radicaux libres varie toutefois d'un composé à l'autre et dépend de plusieurs facteurs.

Mobilité des radicaux libres

Le mouvement des radicaux libres est l'essence même de leur réactivité, puisque de cette façon, ils peuvent entrer facilement en contact avec des molécules organiques ou d'autres radicaux. Sans cette mobilité leur réactivité est faible. Comparé à un milieu liquide, le milieu solide augmente la stabilité des radicaux libres (Bruns et Maxcy, 1979).

Structure chimique

La réactivité des radicaux libres est grandement influencée par la complexité de leur structure chimique. Les radicaux

Figure 3 : **Formation d'ions et de radicaux libres**

Réactions primaires

– Pour l'ionisation d'une molécule AB, on a :

$$AB \rightsquigarrow AB^+ + e^-$$
$$AB^+ \longrightarrow A^+ + B^\bullet$$
$$AB \rightsquigarrow A^+ + B^\bullet + e^-$$

A^+ et AB^+ sont des ions.

$B^\bullet$ est un radical libre.

e^- symbolise l'électron.

$\rightsquigarrow$ radiation

$\longrightarrow$ réaction chimique

– Pour l'excitation de cette même molécule AB, on a :

$$AB \rightsquigarrow AB^*$$
$$AB^* \longrightarrow A^\bullet + B^\bullet$$

Il se produit une coupure homolytique de la liaison A-B.

Réactions secondaires

$$AB + e^- \longrightarrow AB^-$$
$$AB + e^- \longrightarrow A^\bullet + B^-$$
$$CD + e^- \longrightarrow CD^-$$
$$AB^+ + e^- \longrightarrow AB$$
$$AB^+ + CD^- \longrightarrow AB + CD.$$

CD est une molécule chimique

(Vasseur, 1991)

libres pourvus d'une organisation simple et ayant un faible poids moléculaire vont réagir beaucoup plus rapidement grâce à leur mobilité élevée. Par contre, lorsque leur structure chimique est peu souple et très encombrée stériquement (ex: carbone tétrasubstitué), le temps de réaction de ce type de radical augmente de quelques secondes à quelques minutes. Possédant une faible mobilité, les radicaux libres de structure chimique complexe sont contraints à réagir avec leur environnement immédiat (Simic, 1983).

Oxygène

La présence d'oxygène est un facteur très important pour la propagation des radicaux libres (Fennema, 1985). Par sa nature biradicalaire (2 électrons célibataires), l'oxygène est très réactif avec les radicaux libres et les liaisons insaturées. Il entraîne la formation de produits de radiolyse contenant des ponts peroxydes (-O···O-) très peu stables (Vasseur, 1991).

Température

La température est le troisième élément majeur affectant la formation des produits de radiolyse. Plus la température d'un milieu est élevée, plus sa viscosité est faible, ce qui augmente la mobilité des radicaux libres et la formation de produits de radiolyse (Urbain, 1986).

pH

Le pH affecte le processus de la radiolyse de l'eau. En modifiant la composition ionique de l'eau, il transforme ainsi les conditions de réaction de formation de produits de radiolyse lorsque la teneur en eau est élevée (Urbain, 1986).

2.2.3 Rayons gamma vs rayons bêta

L'irradiation gamma et bêta se distinguent par deux caractéristiques majeures soit: le débit de la dose d'irradiation et le pouvoir pénétrant des rayons (Hayashi, 1991).

2.2.3.1 Débit de la dose d'irradiation

Le débit de la dose d'irradiation est une mesure de la puissance d'une source émettrice de radiations s'exprimant en quantité d'énergie absorbée par la matière sur le temps d'exposition. Le traitement par électrons accélérés possède un débit de la dose d'environ 1 million de fois plus élevé que le ^{60}Co (Hayashi, 1991). Plusieurs auteurs ont démontré qu'une différence élevée du débit de la dose peut modifier la composition en produits de radiolyse (Azuma et al., 1984, et Taub et al., 1979). A un débit élevé, la formation et la recombinaison des radicaux libres sont importantes comparativement à un débit faible du fait que l'oxygène en présence ne peut jouer son rôle d'oxydant (Hayashi, 1991).

2.2.3.2 Pouvoir pénétrant

Cette caractéristique s'explique par la nature physique des deux rayonnements. Prenant la forme d'ondes et non de matière, les photons (rayons gamma) n'interfèrent pas comme les électrons accélérés (rayons bêta) avec le produit irradié. Les rayons gamma ne sont pas stoppés et peuvent pénétrer plusieurs mètres de matière organique alors que les rayons bêta sont immédiatement arrêtés par quelques centimètres au plus (Hayashi, 1991) (figure 2). Ainsi les produits à irradier à l'aide d'accélérateurs d'électrons doivent être distribués en minces couches (aliments en vrac et films d'emballages) ou nécessiter un traitement de surface. Les photons hautement énergétiques émis par le ^{60}Co sont plus pénétrants que les électrons accélérés et parviennent jusqu'au coeur du produit (Selman, 1982).

2.3 Irradiation du matériel biologique

2.3.1 Principe d'inactivation

L'inactivation du matériel biologique ne résulte qu'en partie de l'action directe du rayonnement (Brock et Madigan, 1988). Certains constituants cellulaires agiraient toutefois comme cibles privilégiées du rayonnement (Grecz et al, 1983). L'inactivation provient plutôt de l'action indirecte des radicaux libres. Parmi ces radicaux libres, le radical ·OH formé lors de la radiolyse de l'eau est le plus actif. Grâce à son puissant potentiel oxydant, il est responsable du dommage

causé à l'ADN (Brock et Madigan, 1988). L'ADN est une molécule biologique très radiosensible et étant donné son rôle essentiel au niveau du métabolisme cellulaire ainsi que sa faible quantité, son endommagement entraîne un choc important voir même létal pour la cellule (Grecz et al. 1983). Les réactions les plus fréquentes causées à l'ADN sont: la rupture des brins par le radical libre ·OH, l'hydroxylation des bases (adénine, thymine, cytosine, guanine), l'hydrolyse des sucres et la formation de pontages illégitimes entre les bases (Vasseur, 1991).

2.3.2 Radiorésistance

Plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques régissent la résistance du matériel biologique à l'irradiation. Les facteurs les plus importants sont présentés dans les deux prochaines sections.

2.3.2.1 Facteurs intrinsèques

Complexité cellulaire

La complexité de l'organisation cellulaire affecte la radiorésistance du matériel biologique (tableau 2). Les cellules procaryotes sont habituellement avantagées sur les eucaryotes grâce à leur organisation simple. Les eucaryotes ont une radiorésistance plus faible que les procaryotes puisqu'elles possèdent une quantité d'ADN 10 fois supérieure à

Tableau 2 : **Doses recommandées pour inactiver le matériel biologique.**

EFFET OBTENU	DOSES EFFICACES (KGy)
Inhibition des germinations de bulbes et tubercules	0,04 à 0,10
Stérilisation des insectes	0,03 à 0,20
Destruction des insectes	1 à 3
Radicidation (destruction des pathogènes) ou diminution de la charge microbienne	1 à 4
Radurisation (pasteurisation)	1 à 6
Radappertisation (stérilisation)	15 à 50
Destruction des virus	20
Inhibition des activités enzymatiques	60

(Bureau, 1989)

ces dernières. Toutefois certaines moisissures filamenteuses sont très radiorésistantes grâce à la présence de plusieurs noyaux dans la même cellule (Grecz et al, 1983).

Système de réparation de l'ADN

Un des facteurs grandement responsable de la radiorésistance des microorganismes est l'efficacité du système de réparation de l'ADN endommagé par la radiation ionisante. Une fois atteint, l'ADN stimule sa propre réparation par l'intermédiaire de gènes codant pour des enzymes de réparation et de recombinaison d'ADN (Subramani, 1991). Les groupes d'enzymes impliqués sont les exonucléases, les polymérases et les ligases. Certains de ces mécanismes de réparation perdent leur efficacité à des doses et des débits de la dose d'irradiation élevés (Vasseur, 1991).

Paroi et membrane cellulaire

La structure de la paroi cellulaire influence également la radiorésistance des bactéries. Thornley, cité par Anellis et al. (1973), notait déjà en 1963 que les bactéries à coloration Gram+ sont plus résistantes que les bactéries à coloration Gram-, sans toutefois présenter d'explication à ce phénomène. D'autres chercheurs se sont penchés sur la membrane cytoplasmique de la cellule comme cible de la radiation (Redpath et Patterson, 1978 et Khare et al., 1982). Ils concluent que la composition lipidique de la membrane augmente la radioré-

sistance du microorganisme en agissant à titre de bouclier pour l'ADN par réaction avec les radicaux libres peroxyles et hydroxyles produits.

État de dormance vs végétatif

L'état de dormance augmente de façon importante la radiorésistance d'un microorganisme contrairement à son état végétatif (Maxcy, 1983). Cette radiorésistance supérieure est causée en majeure partie par la faible teneur en eau retrouvée chez le microorganisme à cette étape du cycle vital (Grecz et al, 1983).

Phase de croissance

Les effets de la phase de croissance sur la radiorésistance microbienne sont variables. Plusieurs chercheurs s'entendent pour affirmer que les microorganismes en phase exponentielle sont plus sensibles à différents stress et qu'ils sont plus résistants lorsque la croissance est ralentie ou arrêtée (Dupuis et Trémeau, 1962, Lambert et Maxcy, 1984 et Cooper, 1991). Les travaux d'autres chercheurs (Dion et al. 1994) semblent indiquer toutefois que la phase de croissance n'a qu'un effet variable sur la radiorésistance bactérienne.

2.3.2.2 Facteurs extrinsèques

Plusieurs facteurs extrinsèques ont des répercussions importantes sur la résistance à l'irradiation des microorganis-

mes soit: les conditions de culture (pH, température, oxygène et composition) et les conditions d'irradiation (dose et débit de la dose). La plupart ayant été décrits dans la section 2.2.2.2, seuls la composition du milieu de croissance et le débit de la dose d'irradiation sont développés dans cette section.

Composition du milieu

La composition du milieu est d'une importance significative. Le contenu en eau augmente la formation de produits de radiolyse néfastes pour les microorganismes. Par contre, la teneur élevée en matière organique, réduit l'effet des radicaux libres chez les microorganismes (Dupuis et Trémeau 1962, et Diehl, 1990). Dans ce type de milieu, les radicaux libres sont susceptibles de se disperser et de se recombiner à la matière organique, ce qui réduit leur action sur les microorganismes (Dickson et Maxcy, 1984).

Débit de la dose d'irradiation

De nombreux travaux ont prouvé que le débit de la dose d'irradiation affecte la quantité et le type de produits de radiolyse d'un aliment ou d'une substance chimique irradié (Hayashi, 1991). Affectés par ce phénomène, certains microorganismes, comme les levures, résistent mieux à un faible débit qu'à un débit élevé ce qui est relié à l'efficacité limite de leur système enzymatique de réparation (Boreham et Mitchell,

1991 et Frankenberg-Schwager et al., 1980). De plus, l'équipe de Frankenberg-Schwager a démontré que le nombre de bris de chaînes d'ADN augmente lorsque le débit de la dose d'irradiation passe de 0,33 kGy/h à 78 kGy/y. Les travaux de Dion et al. (1994), sur des procaryotes, démontrent également que le débit de la dose d'irradiation n'entraîne pas de modification sur leur radiorésistance, cette fois-ci entre 0,78 kGy/h et 22 kGy/h.

2.3.3 Évaluation de la radiosensibilité microbienne

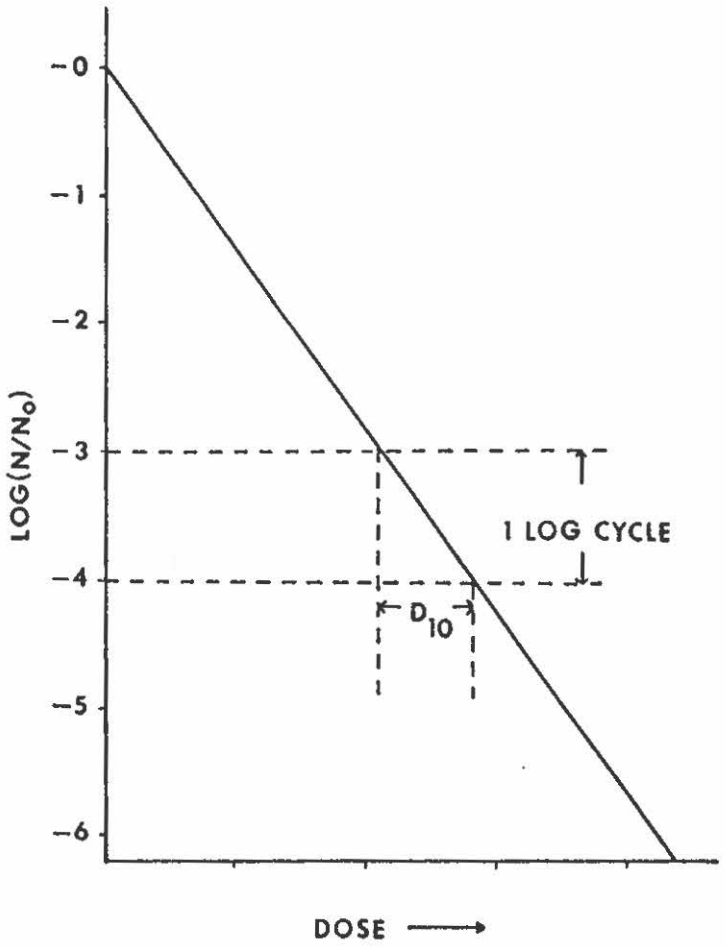
Pour évaluer la radiorésistance relative des microorganismes, deux techniques peuvent être appliquées. Il s'agit de l'établissement de la courbe de survie et de la détermination de la dose létale.

Courbe de survie

La première technique, la plus employée, est celle de la courbe de survie. Cette technique consiste à évaluer la dose requise pour réduire une population microbienne à 10% de sa concentration initiale par un traitement chimique ou physique. Il est convenu de la nommer: la dose de réduction décimale (D_{10} ou DRD) (figure 4). La sensibilité d'un microorganisme est alors exprimée par la formule suivante:

$$D_{10} = \frac{\text{Dose d'irradiation}}{\log(\text{population initiale}) - \log(\text{survivants})}$$

Figure 4 : **Courbe de survie théorique: relation entre la dose et le logarithme du nombre de microorganismes survivant à l'irradiation.**



N_0 : Population initiale
N : Survivants

(Urbain, 1986)

La létalité d'un traitement d'irradiation chez les bactéries et les levures s'évalue par cette technique. Ces microorganismes unicellulaires peuvent être dénombrés plus facilement par un compte d'unités formatrices de colonies que le type pluricellulaire, comme les moisissures (IAEA, 1982).

Dose létale

La technique de la dose létale est généralement employée pour les moisissures. Elle permet de déterminer la dose minimale causant l'inactivation totale des microorganismes. L'établissement d'une courbe exponentielle de survie demeure difficile chez les moisissures contrairement aux bactéries et levures. Les moisissures peuvent libérer des conidies de façon aléatoire dans le milieu de culture et la structure mycélienne de ce type de microorganisme implique un nombre élevé de cellules par thalle biaisant les comptes fongiques (IAEA, 1982).

2.3.4 Formation de mutants

La présence de microorganismes mutants existe dans l'environnement. Bien souvent ces mutations spontanées sont causées par la radiation naturelle altérant la structure des bases de l'ADN. Les microorganismes affectés peuvent perdre des aptitudes métaboliques, leur motilité, leur capsule ou changer d'apparence sur boîte de Petri. Leur sensibilité aux températures basses et élevées ou leur résistance à certains virus et

composés toxiques peuvent augmenter après mutation. La production d'un faible nombre de mutations spontanées a été estimée à l'intérieur de groupes de microorganismes à environ tous les 10^6 à 10^{10} réplications (Brock et Madigan, 1988).

L'irradiation peut être responsable de la formation de mutants du même genre et possédant, parfois, une radiorésistance plus élevée (Subramani, 1991). L'induction de mutations est liée à l'action néfaste des radicaux libres, principalement des radicaux ·OH sur l'ADN (Brock et Madigan, 1988). L'incidence de ces mutations est reliée à plusieurs facteurs dont: l'efficacité du système de réparation du microorganisme (Koudela et al., 1992) et la dose d'irradiation (Boreham et Mitchell, 1991).

2.3.5 Souches microbiennes étudiées

2.3.5.1 *Pseudomonas fragi*

Morphologie

Pseudomonas fragi fait partie de la famille des *Pseudomonadaceae*. C'est une bactérie Gram- qui prend la forme de bâtonnets légèrement incurvés dont la taille varie de 0,5 à 1 sur 0,75 à 4 microns. Les bâtonnets sont rencontrés seuls, par deux ou par chaînes. Cette bactérie assure sa mobilité grâce à un flagelle polaire (Hussong et al. (1937) cité par Breed et al. (1957)).

Croissance

Pseudomonas fragi croît à une température de 10 à 30°C, mais pas à 37°C. Elle possède un métabolisme aérobie et sur milieu solide les colonies apparaissent convexes, scintillantes généralement crémeuses et, parfois, gluantes. Les colonies peuvent être lisses ou rugueuses. Une croissance abondante et étalée dégage une odeur d'ester. En milieu liquide, la turbidité est importante et accompagnée d'une sédimentation avec formation d'une fine pellicule à la surface. Dans le lait de Litmus, cette bactérie provoque l'acidification du milieu, suivi d'une formation d'un coagulum à la surface. La coagulation est complète après 2 à 3 semaines et est accompagnée d'une odeur de fraise ou de fleur de Mai. Hussong et al. (1937) et Nashif et Nelson (1953) cités par Breed et al. (1957) font une bonne description des principaux caractères biochimiques de *P. fragi*.

Incidence alimentaire

Pseudomonas fragi est grandement associée à la dégradation des viandes et des produits laitiers. Le genre *Pseudomonas* provoque deux types d'altérations soient: la putréfaction produisant des composés volatils très odorants et le rancissement (Labadie et Dousset, 1989). Générant des protéases et des lipases, le genre *Pseudomonas* est impliqué dans le processus de rancissement même à basse température (Airaba, 1980).

Résistance à l'irradiation

À l'exception de *Pseudomonas radiora* retrouvée sur le riz et qui possède une grande résistance face à l'irradiation (Urbain, 1986), le genre *Pseudomonas* est très faiblement radiorésistant. Des travaux d'irradiation, sur le boeuf haché, soulignent ce caractère (Okafor, 1973 et Lefebvre et al, 1992). D'autres recherches, sur les produits marins, démontrent qu'une dose de 0,25 kGy élimine rapidement les bactéries *Pseudomonas* des filets de morue (Green et Kaylor, 1977) et de la crevette (Charbonneau et al. 1986).

2.3.5.2 *Aspergillus flavus*

Morphologie

Aspergillus flavus est une moisissure appartenant à la famille des *Fungi imperfecti*. Elle présente sur un milieu de culture solide un thalle à revers incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotes, jaune orangé sur milieu A.F.P.A (*Aspergillus flavus/parasiticus* Agar). Ces têtes conidiennes sont unisériées ou bisériées, radiées puis se scindent en plusieurs colonnes sporales mal individualisées d'abord jaunâtres, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores sont d'aspect hyalin, verruqueux atteignant une longueur de 1 mm à 2,5 mm. Le genre *Aspergillus* comprend 180 espèces réparties en 18 groupes essentiellement définis d'après les caractères de l'appareil reproducteur (Botton, 1990).

Croissance

La croissance de ce type de moisissure est rapide puisque la germination des conidies à température de la pièce a lieu en quelques heures et les hyphes s'élongent de plusieurs millimètres en 24 heures (Anderson et Smith, 1972). *Aspergillus* n'est pas une moisissure exigeante et peut être cultivée sur des milieux communs à base d'extrait de levure et de sucrose ou à base d'extrait de pomme de terre (Arino et Bullerman, 1993 et Zeringue et Bhatnagar, 1994). Les milieux à base de farine de céréales (blé, soya) sont excellents pour la production accélérée des conidies (Hobbs, 1989).

Incidence alimentaire

Comme beaucoup de moisissures, *Aspergillus flavus* entraîne des pertes alimentaires importantes dans l'industrie. Elles sont imputables à son appareil reproducteur aérien et à son aptitude à croître sur des milieux à faible teneur en eau et sur des milieux acides et sucrés. De plus, la synthèse de divers antibiotiques et de composés très toxiques et carcinogènes comme les aflatoxines préoccupe grandement. La souche étudiée *Aspergillus flavus* ATCC 28532 produit en particulier l'aflatoxine B_1, la plus puissante. Ce benzofurane est à l'origine de la maladie X de la dinde (Yano, 1990). Cette moisissure est retrouvée sur plusieurs denrées alimentaires et spécialement, dans les produits transformés à partir de graines d'oléagineux et de céréales. *Aspergillus flavus* est également

responsable d'aspergillose pulmonaire suite à l'inhalation de spores (Botton, 1990).

Résistance à l'irradiation

Les cellules eucaryotes sont habituellement peu radiorésistantes toutefois certaines moisissures filamenteuses résistent bien à l'irradiation (section 2.3.2.1). C'est le cas d'*Aspergillus flavus* qui possède une dose d'irradiation létale de 2,5 à 3,0 kGy pour les cellules végétatives et une D_{10} de 0,6 kGy pour les conidies (Saleh et al., 1988).

2.3.5.3 *Candida albicans*

Morphologie

Candida albicans est une levure de la famille des *Cryptococcaceae* dont le genre comprend 81 espèces. Elle peut être rencontrée habituellement sous la forme de cellules bourgeonnantes et de pseudo-hyphes portant des spores caractéristiques à *Candida albicans* sur milieu solide à base de maïs (Davis et al., 1980).

Croissance

Candida albicans croît sur des milieux conventionnels à la température ambiante ou à la température optimale de 37°C. Sur milieu solide, les jeunes colonies sont lisses, crémeuses et ressemblent à des colonies bactériennes. Plus âgées, les colonies sont d'apparences rugueuses et ridées (Davis et al.,

1980). L'activité fermentative des sucres par *C.albicans* a été décrite par Soltys (1963).

Incidence alimentaire

Candida albicans est une levure pouvant contaminer différents produits sucrés (Bellin, 1989). Ce genre est aussi retrouvé dans les aliments hautement acides, salés et riches en matières grasses tel que le beurre et la margarine où il cause de la lipolyse (Frazier et Westhoff, 1988).

Résistance à l'irradiation

Les levures possèdent habituellement un bonne radiorésistance grâce à la grande efficacité de leur système de réparation d'ADN. D'après les expériences de Khare et al. (1982), la D_{10} de *Candida albicans* est d'environ 0,75 kGy lorsqu'irradiée dans un milieu synthétique minimal.

2.4 Irradiation des emballages plastiques

L'irradiation des aliments est un traitement de conservation à froid. Il ne cause pas d'élévation de température néfaste sur les matériaux d'emballage faiblement résistants à la chaleur. L'utilisation d'un emballage de matière plastique, en combinaison avec l'irradiation, évite la recontamination microbienne des aliments traités et permet également de bénéficier des propriétés de conservation intéressantes de ce type de matériau. L'irradiation des aliments pré-emballés peut

toutefois causer certains changements chimiques et physiques sur les emballages plastiques.

2.4.1 Changements fondamentaux

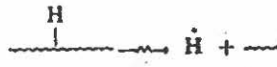
Les mécanismes principaux associés au rayonnement ionisant sur les polymères sont des réactions de scission (dégradation) et de formation de liens chimiques (réticulation) qui peuvent avoir lieu simultanément et dont l'action résultante s'observe par le changement des propriétés physiques et mécaniques des polymères (Elias, 1979 et Buchalla et al., 1993). Les liens simples "carbone-carbone" (C-C) et "carbone-hydrogène" (C-H) du polymère, une fois coupés par ionisation, génèrent des fragments de chaînes de polymères et des atomes d'hydrogène portant un électron libre leur permettant de s'associer entre-eux et de former de nouveaux produits (figure 5). Par exemple, les radicaux libres ·H s'unissent pour former de l'hydrogène gazeux stable (Tripp, 1959 et Killoran, 1972). On assiste également à la scission de groupements fonctionnels de certains polymères ou d'additifs ajoutés à la matière plastique qui sont transformés en divers radicaux libres (Elias, 1979 et Bureau, 1989). En présence d'oxygène (figure 5), il y a une augmentation de la scission des chaînes de polymères menant à la formation de peroxydes, d'alcools, de groupements fonctionnels carbonyles, de monoxyde et de dioxyde de carbone ainsi que de plusieurs composés de faible poids moléculaire contenant de l'oxygène (Elias, 1979 et Buchalla et al., 1993).

Figure 5 : **Réticulation, dégradation et action de l'oxygène lors de l'irradiation du polyéthylène**

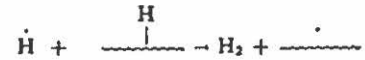
Réticulation

: macromolécule contenant un hydrogène

Radiolyse d'une section du polymère:

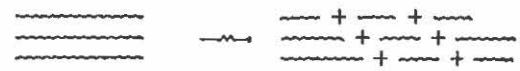


Arrachement de l'hydrogène d'une section voisine:



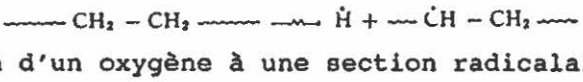
Combinaison de sections radicalaires:

Dégradation

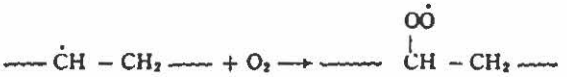


Action de l'oxygène

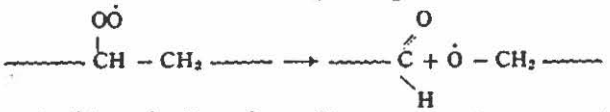
Radiolyse du polyéthylène:



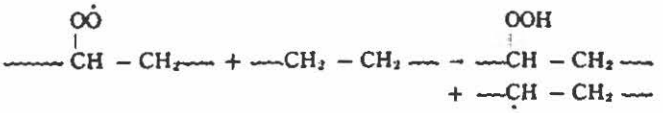
Addition d'un oxygène à une section radicalaire:



Réarrangement d'un radical peroxyde:



Arrachement d'un hydrogène d'une section voisine:



Décomposition des hydroperoxydes (ex: entreposage)

(Chapiro, 1969)

L'action indirecte sur le matériel plastique est moins importante et moins rapide que dans les systèmes biologiques. L'absence d'eau ne génère pas de radicaux libres actifs ·OH et limite la mobilité des autres radicaux libres générés par le plastique. Cela entraîne un phénomène particulier, le vieillissement à long terme. Habituellement, les radicaux libres se recombinent rapidement pour former des produits de radiolyse secondaires. Les radicaux libres formés dans un polymère d'emballage sont immobilisés et mettent un temps plus long à réagir entres eux (Wenxiu et al., 1985). Les radicaux libres les plus réactifs forment chez certains plastiques, comme le polyéthylène, des composés de faible poids moléculaire souvent volatils. Ils sont libérés directement dans l'espace de tête de l'emballage ou demeurent emprisonnés dans la matrice plastique (El Makhzoumi, 1991). Ces multiples réactions chimiques sur la matière plastique, suite à l'irradiation, sont reliées à de nombreux paramètres intrinsèques et extrinsèques.

2.4.2 Facteurs intrinsèques et extrinsèques

De nombreux facteurs influencent les effets de l'irradiation sur la matière plastique et ont déjà été mentionnés à la section 2.2. La composition du polymère et le procédé de fabrication de la matière plastique se révèlent également très importants (Buchalla et al., 1993).

Le plastique d'emballage est un mélange complexe de plusieurs substances chimiques autres que le polymère de base,

celui-ci étant l'ingrédient majoritaire. En fonction des propriétés désirées du plastique, de nombreux additifs peuvent être inclus (stabilisants, antioxydants, antistatiques, anti-glissants, plastifiants, etc.). L'étude de l'irradiation des plastiques devient, à ce moment, plus complexe étant donné la variété de substances retrouvées dans le matériau. La stabilisation à l'irradiation d'un plastique est souvent exercée par l'ajout d'antioxydant. Les antioxydants dégradés sont souvent retrouvés comme produits de radiolyse libérés par le polymère (El Makhzoumi, 1991). Afin d'améliorer la stabilité des plastiques, l'utilisation de polymères à base de groupements fonctionnels phényles (PS, PET) ou de liens amides (Nylon) procure à ces polymères ou matériaux d'emballage une bonne radiorésistance (Elias, 1979).

2.4.3 Propriétés physiques et mécaniques

En général, les propriétés physiques semblent peu affectées par la radiation ionisante. Les études de Varsanyi (1974; 1975) sur les changements de structure et de crystallinité de la matière plastique n'indiquent pas de différence par spectroscopie IR et par des tests de rétrécissement à la chaleur pour le PEBD, PP, PVC, PET et PVDC entre 0 et 8 kGy. LeClair et Cobbs (1958) démontrent que la force du scellage à la chaleur, les propriétés de conduction et la solubilité de plusieurs polymères lorsqu'irradiés entre 10 et 30 kGy demeurent inchangées. De plus, le contact de simulants alimentaires

(solution d'acide lactique et huile de coton) affecte certains types de polymères (craquements et fuites aux plis de l'emballage) irradiés à des doses de 10, 30, et 60 kGy (Feazel et al., 1960).

Les travaux de Rojas de Gante et Pascat (1990) d'irradiation entre 5 et 25 kGy du PEBD et PP permettent d'observer le maintien de la perméabilité à l'oxygène de ces polymères. Les mêmes conclusions s'observent pour une variété de plastiques irradiés entre 0 et 8 kGy (PEBD, PEHD, PP, PET, PVC, PVDC) pour l'azote, le dioxyde de carbone (Varsanyi, 1975). La perméabilité à la vapeur d'eau PEBD demeure également inchangée à des doses inférieures à 10 kGy selon Pillette (1990). À des doses très élevées (10 à 1000 kGy), la perméabilité à la vapeur d'eau ne change pas pour les PEBD, PC et polyester-PEBD (Buchalla et al., 1993).

Contrairement aux propriétés physiques, les propriétés mécaniques semblent plus affectées par l'irradiation mais à des doses supérieures aux doses appliquées lors de l'irradiation alimentaire. Pour certains polymères, la dégradation des propriétés mécaniques dépend fortement du type d'additif (stabilisant-antioxydant) en présence (Wilski, 1987). Ce même auteur affirme que des doses variant entre 5 et 30 kGy peuvent diminuer de moitié la résistance à la rupture du PEHD et du PP selon le type de stabilisant. Toutefois, Senior (1992) cité par Buchalla et al (1993), n'indique pas de changement pour le

PEHD et le PET sinon qu'une faible réduction de la résistance à la rupture et à l'étirement pour le PEBD à 15 kGy. Finalement, dans deux de ses articles, Varsanyi considère peu de différence significative pour les mêmes propriétés chez le PEBD (Varsanyi, 1972) et le PP (Varsanyi et al., 1972) irradiés de 0 à 8 kGy.

2.4.4 Propriétés chimiques

2.4.4.1 Modifications chimiques internes

Spectroscopie infra-rouge (IR)

Deux équipes de chercheurs arrivent à la conclusion qu'aucune différence significative n'apparaît à l'IR lors de l'irradiation entre 0 et 50 kGy pour le PEBD et le PP (Rojas de Gante et Pascat, 1990) et pour les PEBD, PEHD, PET, PS et PVC (Bersch et al., 1959). De fortes bandes reliées à la formation d'insaturations trans (CH=CH) ainsi que de bandes associées aux groupes hydroxyles et carbonyles apparaissent à 60 kGy telles qu'observées par Killoran (1972) et à plus de 100 kGy selon Rojas de Gante et Pascat (1990) pour le PE. Schmidt-Lorenz et Grünewald (1963) détectent à des doses plus faibles (10 kGy) (PEBD et PEHD) un accroissement des bandes hydroxyles et carbonyles. Ils déclarent toutefois la faible sensibilité de l'IR pour l'analyse de polymères irradiés.

Spectroscopie de résonnance de spin d'électron (RSE)

Cette technique, permettant de vérifier la présence de radicaux libres prisonniers dans la matrice du polymère, a permis aux chercheurs Horng et Klemchuk (1984) de conclure que le PS (très radiorésistant) ne générait pas de radicaux libres à 25 kGy par rapport au PP qui produisait une très forte concentration de radicaux alkyles et peroxyles. Plusieurs autres polymères ont été analysés par RSE et il a été constaté que la présence de radicaux libres se mesurait jusqu'à deux mois après une irradiation à 10 kGy (Onderdeliden et Strackee, 1974).

Actuellement, il n'est pas encore clair si la formation de ces radicaux libres, dans des conditions d'utilisation normales, peut constituer un risque pour la santé (Buchalla et al., 1993).

2.4.4.2 Migration

Les résultats de migration globale obtenus par Rojas de Gante et Pascat (1990) démontrent que, jusqu'à 25 kGy, il n'y a pas de changements significatifs lors des extractions du PEBD et PP dans l'eau distillée, l'alcool 15% et l'acide acétique 3%. La quantité de composés chimiques extraits était sous la norme de la Communauté Européenne (CE) de 1 mg/dm^2. Senior (1992) cité par Buchalla et al. (1993) confirme des résultats similaires pour le PE et PP à 15 kGy dans des solvants aqueux

et l'huile d'olive. Toutefois, Pillette (1990) observe une migration plus importante dans l'huile d'olive à partir du film de PE irradié à 10 kGy et dépassant les normes de la CE. D'autres chercheurs constatent que le traitement par électrons accélérés accentue la migration spécifique de produits de radiolyse en comparaison au rayonnement gamma (Lox et al., 1991).

2.4.4.3 Produits de radiolyse volatils

Les études de plusieurs chercheurs (Hegazy et al. 1981, Killoran, 1972, Tripp, 1959 et Bersch et al., 1959) soulignent l'apparition de composés de radiolyse volatils chez certains polymères irradiés (PEBD, PEHD, PP, PVC et PVDC) par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) (tableau 3). L'augmentation de la production de ces composés volatils est reliée à l'accroissement de la dose absorbée, la présence d'oxygène et la densité du matériel (Killoran, 1972). Killoran démontre que le polyéthylène de faible densité émet deux fois plus de composés volatils que celui de haute densité.

Les produits volatils générés par ces polymères sont de l'hydrogène et du méthane (et de l'acide chlorhydrique pour les polymères contenant du chlore) lorsqu'irradiés sous vide. En présence d'oxygène, s'ajoute du monoxyde et du dioxyde de carbone et des hydrocarbures de faible poids moléculaire. Les

Tableau 3 : **Composés volatils générés par irradiation d'emballages plastiques.**

Polymer	Irradiation conditions		Radiolysis products							Method	Ref.
	Dose (kGy)	Atmosphere	(Unit)	H_2	CH_4	Hydroc.	CO_2	CO	H_2O		
LDPE film	10	Vacuum	(µg/g)	10	1	56	1	-	-	GC-MS	(*52*)
	60	Vacuum	"	30	3	191	3	-	-	"	"
	120	Vacuum	"	60	5	339	3	-	-	"	"
LDPE film	9.3	Vacuum	(µmol/g)	0	-	4.23[a]	0.65	0.65	0	MS	(*19*)
		Air	"	0	-	0[a]	2.57	0	0	"	"
	56	Vacuum	"	17.72	-	0.36[a]	0.06	0	0.09	"	"
		Air	"	31.53	-	0.21[a]	3.65	0	1.29	"	"
LDPE	60	Vacuum	(µmol/g)	95.7	-	1.9[b]	0.3	-	0.5	--[c]	(*77*)
		Air	"	93.6	-	0.6[b]	0.3	-	3.8	--[c]	"
HDPE film	60	Vacuum	(µg/g)	34	6	143	4	-	-	GC-MS	(*52*)
	120	Vacuum	"	53	52	171	4	-	-	"	"
HDPE film	9.3	Vacuum	(µmol/g)	2.94	-	0.073[a]	0.03	0.02	0	MS	(*19*)
		Air	"	3.88	-	0[a]	3.23	0	0	"	"
	56	Vacuum	"	15.66	-	0.02[a]	0.02	0	0.03	"	"
		Air	"	18.15	-	0.62[a]	3.51	0	0.21	"	"
HDPE	60	Vacuum	(µmol/g)	98.7	-	0.1[b]	0.1	-	0.2	--[c]	(*77*)
		Air	"	94.6	-	3.2[b]	0.1	-	1.1	--[c]	"
PP film	200	Vacuum	(G value)[d]	2.7	0.08	+[e]	0.01	-	-	GC	(*43*)
		Oxygen, 150 torr	"	2.5	0.05	+[e]	0.21	0.1	-	"	"
	10	Air	(µmol/g)	2.5	0.05		0.21	0.1	-		calc.[f]
	60	Air	"	15	0.3		1.26	0.6	-		"

[a] Sum of entries under oxygenated, saturated, and unsaturated hydrocarbons.
[b] Sum of entries under ethylene, acetone, butene, and propene.
[c] No method given.
[d] G Value: see Table 1 for explanation.
[e] Saturated and unsaturated hydrocarbons (C_2 - C_{10}) were detected by mass spectrometry.
[f] The quantities were calculated assuming that the G values determined at 200 kGy and 150 torr O_2 pressure are valid at lower-dose irradiations in air.

(Buchalla et al., 1993).

résultats sur la composition des substances volatiles générées par le polyéthylène (tableau 3), ne sont toutefois pas très uniformes, ce qui s'explique probablement par les différences entre les techniques de récupération des composés volatils.

Dans la majorité des travaux décrits précédemment, les conditions d'irradiation (hautes doses et atmosphère sous-vide) ne rejoignent pas celles de l'irradiation des aliments, ce qui rend difficile l'extrapolation des quantités de composés volatils produits à de faibles doses. D'autres chercheurs (El Makhzoumi, 1991, Rojas de Gante et Pascat, 1990 et Azuma et al., 1983) procédèrent donc à des analyses sur les mêmes polymères mais à des doses plus faibles et dans des conditions d'oxygénation normales. L'équipe d'Azuma et al. (1983) détecte plus de 100 composés volatils dont 50 sont identifiables par GC-MS pour le PEBD irradié à 20 kGy. Rojas de Gante et Pascat (1990) identifient 100 composés volatils pour le PEBD irradié à 10 et 25 kGy et 58 composés volatils pour le PP irradié à 25 kGy. La majorité de ces composés sont des alcools, des cétones, des aldéhydes, des acides carboxyliques et des alcanes de taille variant de 3 à plus de 10 carbones.

Peu d'auteurs publient de l'information sur les composés volatils générés à des doses inférieures à 5 kGy. Les travaux d'El Makhzoumi (1991) présentent une identification de 20 et 24 composés volatils générés respectivement par le PE et PP irradiés à 5 kGy. L'auteur démontre que certains composés

volatils sont retenus dans la matrice polymérique pour le PP (13 composés) et aucun pour le PEBD lorsqu'ils sont irradiés à l'air libre. Les produits de radiolyse identifiés sont des méthylcétones, des alcanes et des produits de dégradation d'antioxydants (2,6-di(*tert*-butyl)-1,4-benzoquinone, 1,3-di(*tert*-butyl)-benzène et 2,4-di(*tert*-butyl)-phénol).

2.4.5 Polymères résistants à l'irradiation

Les techniques d'analyse décrites précédemment permettent d'évaluer le comportement à l'irradiation de plusieurs polymères et dans le but d'en autoriser l'utilisation avec des denrées alimentaires.

Le rapport du comité mixte AIEA/FAO/OMS de 1981 (WHO, 1981) basé sur plusieurs de ces analyses conclut que :

> *"La méthode et le matériel d'emballage doivent offrir une bonne sécurité et être bien adaptés à la denrée à traiter. L'irradiation ne doit pas avoir d'effets indésirables sur les propriétés des matériels choisis, ni compromettre leur sécurité éprouvée par des méthodes appropriées du genre de celles que l'on applique aux matériaux non-irradiés."*

Aux États-Unis, l'organisme "Food and Drug Administration" autorise l'utilisation de plusieurs matériaux plastiques depuis 1986 (tableau 4).

Au Canada, pour irradier des denrées alimentaires emballées la procédure est complexe. Une requête doit être émise au

Tableau 4 : **Emballages approuvés par le "Food and Drug Administration" pour l'irradiation alimentaire.**

Packaging Material	Maximum Dose (kGy)
Kraft paper	5
glassine paper	10
wax-coated paperboard	10
nitrocellulose-coated cellophane	10
vinylidene chloride copolymer (Saran) coated cellophane	10
vegetable parchment	60
vinylidene chloride-vinyl chloride copolymer film (Saran)	60
vinyl chloride-vinyl acetate copolymer film	10
rubber hydrochloride films	10
ethylene-alkene-1 copolymer	60
polyethylene films	60
nylon-6 films	10
polystyrene films	60
polyethylene terephthalate films	

(CFR, 1986)

Bureau de sécurité chimique (BSC) par le demandeur en fournissant: 1) la description complète du type d'emballage choisi (structure, composition, propriétés relatives à son usage, étanchéité, perméabilité, résistance à l'élongation, etc.), 2) l'utilisation proposée (dimension, forme, ratio nourriture/emballage, type de nourriture, conditions d'entreposage), 3) la pénétration du marché projetée. Par la suite, le BSC peut exiger des renseignements additionnels sur la migration de composantes du polymère, l'analyse des composés volatils générés et une étude toxicologique basée sur la nutrition animale. Après autorisation du BSC, la sécurité de l'emballage pour la consommation demeure sous l'entière responsabilité du requérant (Ripley, 1988).

3.0 COMPOSÉS CHIMIQUES ACTIFS SUR LES MICROORGANISMES

3.1 Évaluation de l'action de composés chimiques sur les microorganismes

Il existe plusieurs techniques pour étudier le comportement des microorganismes en présence de substances chimiques. Selon leur point de vaporisation, l'action de ces composés peut être évaluée en phase liquide ou gazeuse sur des microorganismes en bouillons de culture et sur des milieux solides. Les effets des composés chimiques peuvent être déterminés selon trois techniques principales.

3.1.1 Libération de composés chimiques liquides absorbés dans un support solide.

Cette première technique, fréquemment utilisée, est employée pour mesurer l'activité antimicrobienne de composés chimiques hydrosolubles libérés à partir d'un support poreux (ex: disque de papier) (Együd, 1967, Morris et al., 1979 et Gocho, 1991). Un criblage rapide de nombreuses substances peut être complété par cette technique. Son efficacité repose sur la solubilité du composé ainsi que sur un bon taux de diffusion du milieu. L'étude de substances hydrophobes et/ou volatiles conduit toutefois à une interprétation erronée de leur activité. Ces composés forment des zones d'inhibition de taille réduite autour des disques déposés sur le tapis microbien (Morris et al., 1979).

3.1.2 Addition directe de composés chimiques à un milieu de culture.

Cette technique est employée afin de mesurer l'effet de composés chimiques ajoutés directement à un milieu de culture liquide ou solide. L'action d'un composé sur la production de biomasse est évaluée par la lecture de la densité optique du milieu de culture ou le poids total sec des milieux solides et liquides (Wenlian et al., 1993). La production de métabolites secondaires peut être examinée par des extractions du milieu de culture (Zeringue et Bhatnagar, 1994). L'utilisation d'une culture liquide permet l'étude de microorganismes dans des conditions de sensibilité maximale en sélectionnant un stade de croissance particulier (Worm et al. 1993).

3.1.3 Conditionnement d'un milieu de culture à l'aide de gaz et de composés volatils.

L'étude des effets des gaz et des composés volatils sur les microorganismes peut également se réaliser en milieu liquide ou solide. L'utilisation d'un système de circulation est nécessaire lorsque les substances volatiles proviennent d'une source externe. Dans les cas les plus simples, la source des composés volatils peut être incorporée à l'intérieur d'un montage clos en présence des microorganismes.

L'étude de l'action des substances volatiles sur les microorganismes implique une bonne connaissance de leurs coefficients de partage. Le coefficient de partage (CP) se définit

comme le rapport entre la répartition d'une substance à l'équilibre entre deux solvants ou milieux différents. Dérivé de la loi de Henry pour les gaz à l'équilibre, le CP des composés chimiques est basé sur leur degré d'irradiation, de dimérisation ou d'hydrophobicité dans chaque solvant. Le $CP_{octanol/eau}$ est souvent utilisé pour étudier l'hydrophobicité associée au matériel biologique (Leo et al., 1971).

$$CP = \frac{\text{\% du composé dans le milieu 1}}{\text{\% du composé dans le milieu 2}}$$

La relation entre le coefficient de partage entre l'air et l'eau ($CP_{air/eau}$) et l'activité microbicide de composés volatils est démontrée par Vaughn et al. (1993). Les aldéhydes, les cétones et les alcools sont plus toxiques (10 à 100 fois) en phase gazeuse qu'additionnés directement à un milieu semi-liquide (gélose). Cette toxicité est correlée à la faible solubilité en milieu aqueux de ces composés dont la majeure partie accède directement aux microorganismes par la voie aérienne. Les $CP_{air/eau}$ de plusieurs aldéhydes démontrent que l'augmentation du nombre de carbones de la chaîne carbonée réduit l'hydrosolubilité et abaisse le coefficient de partage (Kay et Kinsella, 1975).

Ballesteros et al. 1992, observent également que le $CP_{lipide/eau}$ est associé aux effets antimicrobiens de composés en solution. Cette équipe de chercheurs indique une corrélation entre leur $CP_{lipide/eau}$ élevé et leur toxicité chez les levures.

Salgueiro et al. (1988) suggèrent l'interférence des composés de faible solubilité avec les sections hydrophobes des membranes cellulaires permettant leur insertion dans la cellule.

3.2 Action des gaz

Les emballages à atmosphère modifiée démontrent un excellent potentiel d'inhibition sur les bactéries, les levures et les moisissures lorsqu'ils contiennent une proportions de CO_2. Le CO_2 possède un pouvoir antibactérien dont le mécanisme d'action repose sur quelques hypothèses: 1) abaissement du pH intracellulaire (Wolfe, 1980), 2) disruption des membranes cellulaires (King et Nagel, 1975) et 3) inhibition et altération de plusieurs groupes d'enzymes (Enfors et Molin, 1981). Le CO_2 peut être efficace à des concentrations atmosphériques de 5 à 50% (v/v) (Lambert, 1991). L'ozone (O_3) est également utilisé dans le domaine alimentaire pour réduire la croissance de plusieurs espèces microbiennes lors de l'entreposage des denrées alimentaires ou comme traitement de décontamination (Broadwater et al. 1973). L'O_3 est un puissant agent oxydant dont l'action antimicrobienne repose principalement sur la grande réactivité envers les liaisons doubles "carbone-carbone" (C=C) (Takamoto et al., 1991). L'ozone peut agir sur plusieurs constituants cellulaires, on sait cependant qu'en entraînant une production de peroxydes et de radicaux libres, l'ozone endommage l'ADN à la manière de la radiation ionisante (Hamelin et al. 1977). L'ozone affecte également la perméabilité

membranaire et les enzymes du cytoplasme (Mehlman et Borek, 1987). La concentration inhibitrice de l'ozone chez *E. coli* est d'environ 0,5 mg/l en milieu aqueux (Takamoto et al., 1991) et de 0,004-5 mg/l dans l'air (Naitoh, 1993).

3.3 Action des composés organiques volatils de faible poids moléculaire

De nombreuses substances naturelles de faible poids moléculaire et volatiles présentent un potentiel d'action contre les microorganismes comme: les alcools, les alcanes, les cétones, les aldéhydes, les acides carboxyliques et plusieurs dérivés benzéniques et phénoliques. Chacun de ces groupes possède un mode d'action particulier et une efficacité variable contre le développement des microorganismes. Gueldner et al. (1985) et Maruzzella et al. (1961) ont observé que la réactivité de ces groupes chimiques, en phase vapeur, décroît dans l'ordre suivant: acides > aldéhydes > alcools > cétones (l'ordre entre certains alcools et cétones peut changer). Les modes d'action de ces substances chimiques accompagnés d'exemples sont décrits dans la section suivante.

3.3.1 Aldéhydes

Pouvoir inhibiteur

Selon la littérature, les aldéhydes de structure linéaire et de faible poids moléculaire sont parmi les composés les plus efficaces contre la propagation des microorganismes (Maruzzella

et al., 1961 et Gueldner et al., 1985). La présence de fonctions carbonyles chez ces composés contribue à leur bon potentiel inhibiteur. Ces groupements, réagissant avec les groupes sulfhydriles (-SH) de protéines (Együd, 1967) et les résidus de cystéine, entraînent aussi la formation de bases de Schiff avec des groupements amines de peptides (Schauenstein et al., 1977). Les aldéhydes possédant deux groupements carbonyles (céto-aldéhydes) (Együd, 1967) ainsi qu'une liaison α,ß-insaturée (Hamilton-Kemp et al., 1992 et Wenlian et al., 1993) possèdent une toxicité accrue. Les aldéhydes peuvent causer la modification de la conformation de protéines liées à la membrane, altérant ainsi sa structure. Ce phénomène a été observé par microscopie électronique sur les hyphes de *Mucor mucedo* par Lyr et Banasiak (1983).

Les aldéhydes de faible poids moléculaire (C6) affichent chez *Pseudomonas syringae* et *Escherichia coli* un potentiel inhibiteur élevé et la présence d'une insaturation augmente ce potentiel de 10 à 100 fois (Wenlian et al., 1993). Les moisissures *Alternaria alternata* et *Botrytis cinerea* sont aussi sensibles que les bactéries à l'action des C6 et des C9 insaturés (Hamilton-Kemp et al., 1992).

Effet stimulateur

Curieusement, à faible concentration, certains aldéhydes exhibent un effet de stimulation sur plusieurs moisissures. Par exemple, les aldéhydes possédant un nombre d'atomes de

carbone de C7 à C10 (Norrman, 1968), de C3, C4, C6 à C11 (Nyman, 1969) et de C6 et C9 (Hamilton-Kemp et al., 1992) augmentent la croissance chez *Pestalotia rhododendri*, *Dipodascus aggregatus* et *Alternaria alternata* respectivement. Dans son article, Nyman (1969) indique que ce comportement est occasionné par des interactions de niveau enzymatique.

3.3.2 Cétones

Les cétones sont des composés ayant un mode d'action similaire aux aldéhydes par la présence d'un groupement carbonyle. Leur potentiel inhibiteur est toutefois plus modéré que les aldéhydes (Együd, 1967). Les travaux de Vaughn et al. (1993) portant sur l'action du 2-nonanone sur *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* et *Colletotrichum gloeosporoides* confirment cet effet inhibiteur. Certaines méthylcétones présentent toutefois une activité nulle ou très faible sur *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* (C7 et C8) (Morris et al., 1979) et sur *Aspergillus flavus* (C4 et C10) (Gueldner et al., 1985).

3.3.3 Alcools

Pouvoir inhibiteur

La lyse cellulaire, principal mécanisme d'action des alcools, entraîne des modifications sur la morphologie de la cellule et particulièrement sur le métabolisme cellulaire comme: la glycolyse enzymatique, la biosynthèse de

peptidoglycan et de protéines et la perméabilité membranaire. L'assemblage du peptidoglycan étant affecté, la force et la forme de la paroi cellulaire, sont considérablement altérées (Ingram, 1981). Les alcools présentent un potentiel inhibiteur à des concentrations relativement élevées dans l'espace de tête des emballages. Les emballages contenant de l'éthanol en phase gazeuse, appelés communément "active packaging", démontrent une action microbicide puissante à plus de 2% (v/v) d'éthanol (Labuza et Breene, 1989). Ce potentiel d'action est toutefois obtenu avec des aliments à teneur en eau intermédiaire (Aw=0.84). Lanciotti et Guerzoni (1993) confirment aussi l'action inhibitrice de l'éthanol et de l'isobutanol volatilisés à des concentrations de 3 à 6% dans l'espace de tête d'un contenant sur *Aspergillus flavus*. Ils démontrent qu'une faible Aw augmente l'effet des composés alcooliques et évite leur passage en solution.

Effet radioprotecteur

Certains alcools possèdent un potentiel radioprotecteur sur les microorganismes lors de l'irradiation. Le mécanisme de radioprotection des alcools est depuis longtemps attribué à l'aptitude de l'alcool à piéger les radicaux libres ·OH grâce à son groupement hydroxyle (Dewey, 1963 et Billen, 1985). Cependant, plusieurs chercheurs observent l'inefficacité relative de certains alcools sur la base de leur réactivité avec les radicaux libres ·OH (k_{OH}) (Cramp, 1969 et Ewing et

Kubala, 1987). Ils en ont conclu que la toxicité de l'alcool est inversement liée au caractère radioprotecteur de l'alcool (Worm et al., 1993). Plus la concentration et l'hydrophobicité ($CP_{octanol/eau} > 1$) de l'alcool sont élevées moins celui-ci offre de radioprotection aux microorganismes irradiés. La phase de croissance exponentielle et la faible capacité de récupération du microorganisme peuvent également augmenter sa sensibilité à l'alcool.

Effet stimulateur

La stimulation de la croissance des moisissures par l'éthanol est soulignée par Garraway et Weinhold (1968). Leurs expériences prouvent que l'éthanol faiblement concentré est responsable d'une meilleure assimilation du glucose marqué au ^{14}C. En présence d'éthanol, une émission plus intense du matériel radioactif provient de l'intérieur de la paroi cellulaire et est observée sous forme polymérisée. Les mécanismes enzymatiques associés à ce phénomène ne sont cependant pas élucidés. Le 1-heptanol à faible concentration (0,2 à 0,8 mg/l d'air) possède également cet effet stimulateur chez *Aspergillus parasiticus* (Zeringuae et Bhatnagar, 1994).

3.3.4 Hydrocarbures

Pouvoir inhibiteur

Les hydrocarbures aliphatiques, plus particulièrement les alcanes linéaires (n-alcane) de faible poids moléculaire comme

l'hexane (C6) et l'heptane (C7), présentent une toxicité élevée pour une variété de microorganismes. L'aptitude de ces composés à dissoudre les lipides est associée à la destruction de membranes et de parois cellulaires de bactéries (Stirling, 1980).

Source de carbone

Certains microorganismes possèdent pourtant une aptitude à dégrader les n-alcanes. Les plus connus appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Nocardia* et *Mycobacteria* (Stirling, 1980). Walker et Colwell démontrent, en 1976, l'aptitude à dégrader les alcanes de haut poids moléculaire (C12 à C30) de l'huile brut par *Pseudomonas* spp.. Colwell (1978) démontre un comportement similaire pour *Candida* et *Penicillium*. Atsuo et Saburo (1989) soulignent également dans leur publication, la capacité de l'espèce *Candida albicans* à utiliser les n-alcanes.

3.3.5 Acides

Maruzzella et al. (1961) indiquent dans leurs travaux que le potentiel antimicrobien de plusieurs acides organiques est supérieur à tous les composés organiques volatils décrits précédemment. Le travail de Sheu et al. (1975) permet de constater l'inhibition du transport d'acides aminés et de céto-acides nécessaires aux bactéries *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* par de nombreux acides carboxyliques. La force d'inhibition de ces acides est reliée à la longueur de la

chaîne carbonée et à l'augmentation du $CP_{octanol/eau}$. Dans sa revue sur les agents antimicrobiens, Eklund (1989) indique que les acides organiques sont principalement responsables de modifications de l'activité enzymatique et de la neutralisation du potentiel électrochimique des microorganismes par l'élévation du pH.

La liste de tous les composés volatils décrits dans la section 3.3, ainsi que d'autres composés appartenant aux mêmes groupes chimiques retrouvés dans la littérature, est présentée au tableau 5.

Tableau 5 : Liste de composés chimiques actifs sur les micro-organismes.

Composés volatils inhibant la croissance microbienne

Composé	Cible	État	CMA (mg/l)	CL50 (mg/l)	CL100 (mg/l)	Réf.
Acide acétique	*Bacillus subtilis*	L	—	4160	—	Sheu et al., 1975
	Escherichia coli	L	—	3712	—	"
Acide propionique	*Bacillus subtilis*	L	—	3200	—	"
	Escherichia coli	L	—	3360	—	"
Acide butyrique	*Bacillus subtilis*	L	—	2880	—	"
	Escherichia coli	L	—	2688	—	"
Acide hexanoique	*Bacillus subtilis*	L	—	1408	—	"
	Escherichia coli	L	—	1024	—	"
Acide octanoique	*Bacillus subtilis*	L	—	259	—	"
	Escherichia coli	L	—	576	—	"
	Candida utilis	L	0.2	—	—	Kubo et al., 1993
	Penicillium chrysogenum	L	0.1	—	—	"
	Trichophyton mentagrophytes	L	0.05	—	—	"
Benzaldéhyde	*Staphylococcus aureus*	L	—	—	1000	Morris et al., 1979
	Escherichia coli	L	—	—	1000	"
	Escherichia coli	G	—	—	—	Gocho, 1991
	Candida albicans	L	—	—	1000	"
	Alternaria alternata	G	21	—	42	Vaughn et al., 1993
	Botrytis cinerea	G	—	—	21	"
	Colletotrichum gloeosporioides	G	—	—	21	"
	Alternaria alternata	L	104	—	1040	"
	Botrytis cinerea	L	104	—	1040	"
	Colletotrichum gloeosporioides	L	104	—	1040	"
Propanal	*Escherichia coli*	L	64	—	—	Egyod, 1967
	Fusarium nivale	G	250	—	>950	Nandi, 1977
	Septoria nodorum	G	250	—	800	"
Butanal	*Escherichia coli*	L	80	—	—	Egyod, 1967
	Fusarium nivale	G	250	—	>950	Nandi, 1977
	Septoria nodorum	G	250	—	700	"
Pentanal	*Escherichia coli*	L	96	—	—	Egyod, 1967
	Fusarium nivale	G	25	—	350	Nandi, 1977
	Septoria nodorum	G	250	—	350	"
4-pentenal	*Aspergillus parasiticus*	G	0.21	—	—	Zeringuae et al., 1994
Hexanal	*Escherichia coli*	G	2.8	—	—	Wenlian et al., 1993
	Pseudomonas syringae	G	2.1	—	—	"
	Fusarium nivale	G	25	—	500	Nandi, 1977
	Septoria nodorum	G	250	—	350	"
	Alternaria alternata	G	0.036	—	>1.43	Hamilton-Kemp et al., 1992
	Botrytis cinerea	G	0.036	—	0.026	"
	Aspergillus parasiticus	G	0.22	0.93	—	Zeringuae et al., 1994
(E)-2-Hexenal	*Escherichia coli*	G	—	—	0.93	Wenlian et al., 1993
	Pseudomonas syringae	G	0.04	—	0.57	"
	Alternaria alternata	G	0.02	—	>0.5	Hamilton-Kemp et al., 1992
	Botrytis cinerea	G	0.02	—	0.025	"
	Alternaria alternata	G	17	—	90	Vaughn et al., 1993
	Botritis cinerea	G	—	—	17	"
	Colletotrichum gloeosporioides	G	—	—	17	"
	Alternaria alternata	L	85	—	850	"
	Botrytis cinerea	L	85	—	850	"
	Colletotrichum gloeosporioides	L	85	—	850	"
	Aspergillus flavus	G	—	—	—	Gueldner et al., 1985
Hexadienal	*Aspergillus flavus*	G	—	—	—	Gueldner et al., 1985
Heptanal	*Escherichia coli*	L	128	—	—	Egyod, 1967
(E)-2-heptenal	*Aspergillus parasiticus*	G	0.23	—	—	Zeringuae et al., 1994
Octanal	*Staphylococcus aureus*	L	—	—	500	Morris et al., 1979
	Escherichia coli	L	—	—	500	"
	Candida albicans	L	—	—	500	"
	Aspergillus parasiticus	G	0.25	—	—	Zeringuae et al., 1994

CMA: Concentration minimale active
CL50: Concentration létale pour 50% de la population
CL100: Concentration létale pour 100% de la population

L: État liquide
G: État gazeux

Tableau 5 : Liste de composés chimiques actifs sur les micro-organismes (suite).

Composés volatils inhibant la croissance microbienne (suite)

Composé	Cible	État	CMA (mg/l)	CL50 (mg/l)	CL100 (mg/l)	Réf.
Nonanal	*Candida albicans*	L	---	---	---	Morris et al., 1979
	Septoria nodorum	G	250	---	600	Nandi, 1977
	Fusarium nivale	G	250	---	>950	"
2-Nonenal	*Septoria nodorum*	G	---	---	125	Nandi, 1977
	Fusarium nivale	G	---	---	250	"
	Alternaria alternata	G	0.002	---	0.06	Hamilton-Kemp et al., 1992
	Botrytis cinerea	G	0.06	---	0.33	"
Undecenal	*Staphylococcus aureus*	L	---	---	50	Morris et al., 1979
	Escherichia coli	L	---	---	>1000	"
	Candida albicans	L	---	---	50	"
Ethanol	*Staphylococcus aureus*	L	50000	---	---	Ballesteros et al., 1992
	Aspergillus flavus	G	23600	---	---	Lanciotti et Guerzoni, 1993
	Moisissures	G	---	---	20000	Labuza et Breene, 1989
1-Hexanol	*Escherichia coli*	G	0.28	---	3.8	Wenlian et al., 1993
	Pseudomonas syringae	G	0.31	---	3.1	"
	Alternaria alternata	G	33	---	80	Vaughn et al., 1993
	Botrytis cinerea	G	16	---	80	"
	Colletotrichum gloeosporioides	G	16	---	80	"
	Alternaria alternata	L	81	---	8100	"
	Botrytis cinerea	L	81	---	8100	"
	Colletotrichum gloeosporioides	L	81	---	8100	"
(E)-2-Hexen-1-ol	*Escherichia coli*	G	---	---	2.3	Wenlian et al., 1993
	Pseudomonas syringae	G	0.14	---	1.1	"
(E)-3-Hexen-1-ol	*Alternaria alternata*	G	30	---	340	Vaughn et al., 1993
	Botrytis cinerea	G	30	---	340	"
	Colletotrichum gloeosporioides	G	30	---	340	"
	Alternaria alternata	L	85	---	8500	"
	Botrytis cinerea	L	85	---	8500	"
	Colletotrichum gloeosporioides	L	85	---	8500	"
1-Octanol	*Escherichia coli*	L	0.4	---	---	Kubo et al., 1993
	Candida utilis	L	0.2	---	---	"
	Penicillium chrysogenum	L	0.2	---	---	"
	Trichophyton mentagrophytes	L	0.2	---	---	"
	Pytosporum ovale	L	0.1	---	---	"
1-Nonanol	*Aspergillus flavus*	G	---	---	---	Gueldner et al., 1985
2-Pentanone	*Escherichia coli*	L	96	---	---	Egyod, 1967
2-Hexanone	*Escherichia coli*	L	112	---	---	"
2-Octanone	*Escherichia coli*	L	144	---	---	"
2-Nonanone	*Escherichia coli*	L	160	---	---	Egyod, 1967
	Alternaria alternata	G	16	---	82	Vaughn et al., 1993
	Botrytis cinerea	G	16	---	82	"
	Colletotrichum gloeosporioides	G	16	---	82	"
	Alternaria alternata	L	82	---	8200	"
	Botrytis cinerea	L	820	---	8200	"
	Colletotrichum gloeosporioides	L	820	---	8200	"
2-Décanone	*Escherichia coli*	L	176	---	---	Egyod, 1967
2-Undécanone	*Escherichia coli*	L	192	---	---	"
Limonène	*Escherichia coli*	G	---	---	---	Gocho, 1991

CMA: Concentration minimale active
CL50: Concentration létale pour 50% de la population
CL100: Concentration létale pour 100% de la population

L: État liquide
G: État gazeux

Tableau 5 : Liste de composés chimiques actifs sur les micro-organismes (suite).

Composés volatils sans effet sur la croissance microbienne

Composé	Cible	État	Réf.
Butanone	*Aspergillus flavus*	G	Gueldner et al., 1985
Heptanone	*Staphylococcus aureus*	L	Morris et al., 1979
	Escherichia coli	"	"
	Candida albicans	"	"
2-octenone	*Staphylococcus aureus*	L	"
	Escherichia coli	"	"
	Candida albicans	"	"
2-décanone	"	G	Gueldner et al., 1985
Limonene	*Alternaria alternata*	G	Hamilton-K. et al., 1992
3-methyl-pentanol	*Staphylococcus aureus*	L	"
	Escherichia coli	"	"
	Candida albicans	"	"

Composés volatils augmentant la radiorésistance microbienne

Composé	Cible	État	[ ] (mg/l)	Réf.
1-Propanol	*Escherichia coli*	L	66000	Worm et al.,
2-Propanol	*Escherichia coli*	L	99000	"
t-Butanol	*Escherichia coli*	L	49200	"

Composés volatils stimulant la croissance microbienne

Composé	Cible	État	[ ] (mg/l)	Réf.
Aldéhydes (C3,C4,C6 à C11)	*Pestalotia rhododendri*	G	—	Nyman, 196 et Norman,
Hexanal	*Alternaria alternata*	G	0.004	Hamilton-K.
	Botrytis cinerea	G	0.004	"
Nonanal	*Alternaria alternata*	G	0.003	"
	Botrytis cinerea	G	0.003	"
	Fusarium nivale	G	—	Nyman, 196
Limonene	*Botrytis cinerea*	G	0.65	"
Alcanes (C12 à C30)	*Pseudomonas sp.*	L	—	Walker et C
Alcanes	*Candida albicans*	—	—	Rose et Har
1-heptanol	*Aspergillus parasiticus*	G	0.2-0.8	Zeringue et

L: État liquide
G: État gazeux

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.0 ANALYSE DES COMPOSÉS VOLATILS DU PEBD

1.1 Préparation des échantillons

Le polyéthylène de basse densité (PEBD) de type SL-3, gracieusement fourni par la compagnie DuPont Canada (Whitby, Canada), a été employé pour nos expériences d'analyse de composés volatils ainsi que pour les analyses microbiologiques. Nous avons eu la chance d'étudier deux types de PEDB SL-3, le premier étant fabriqué depuis 1 an et le second depuis plus de 10 ans. Ces deux polyéthylènes ont permis de vérifier quelle était la variation du profil des composés volatils générés lors de leur irradiation en fonction de leur âge.

Des échantillons de film de PEBD de 5 cm^2 et de 105 cm^2, pour la chromatographie par GC-FID et par GC-MS respectivement, ont été découpés et insérés à l'intérieur d'un tube de verre. A chaque extrémité, deux valves à pointeau d'acier inoxydable étaient fixées pour assurer l'étanchéité du système (figure 6).

1.2 Irradiation

Le montage était ensuite traité dans un irradiateur de type Gammabeam 651 PT (Nordion International inc., Kanata, Canada) à un débit de la dose d'irradiation de 3,2 kGy/h et aux doses indiqué dans la section 1.4.

Figure 6 : **Montage employé pour la production des composés volatils provenant du plastique irradié.**

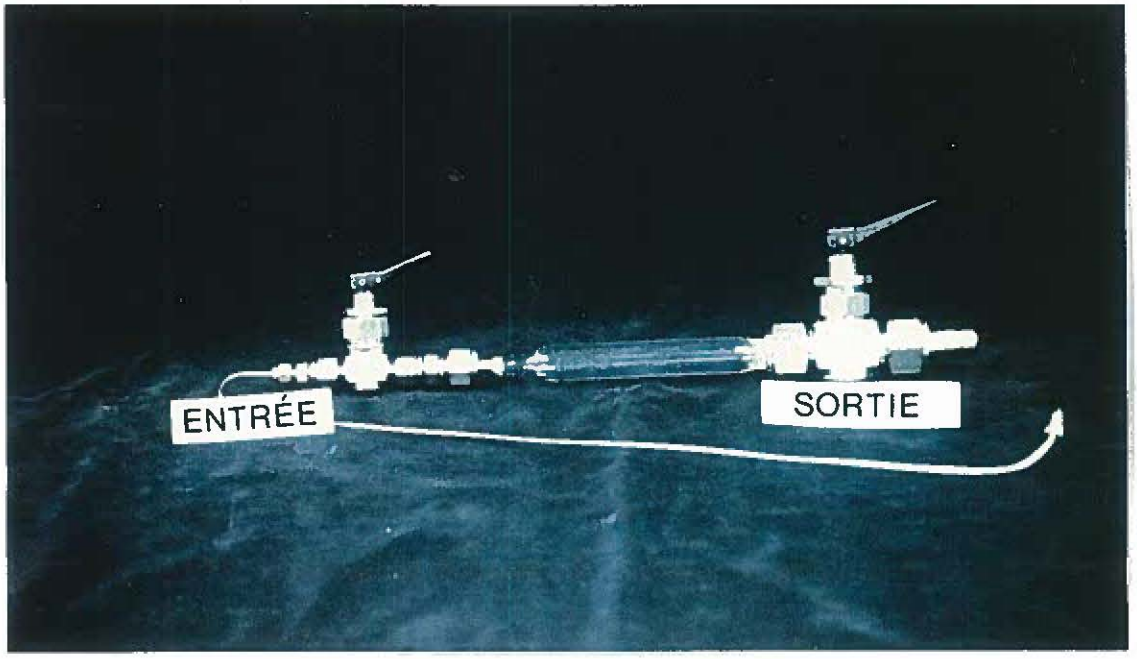
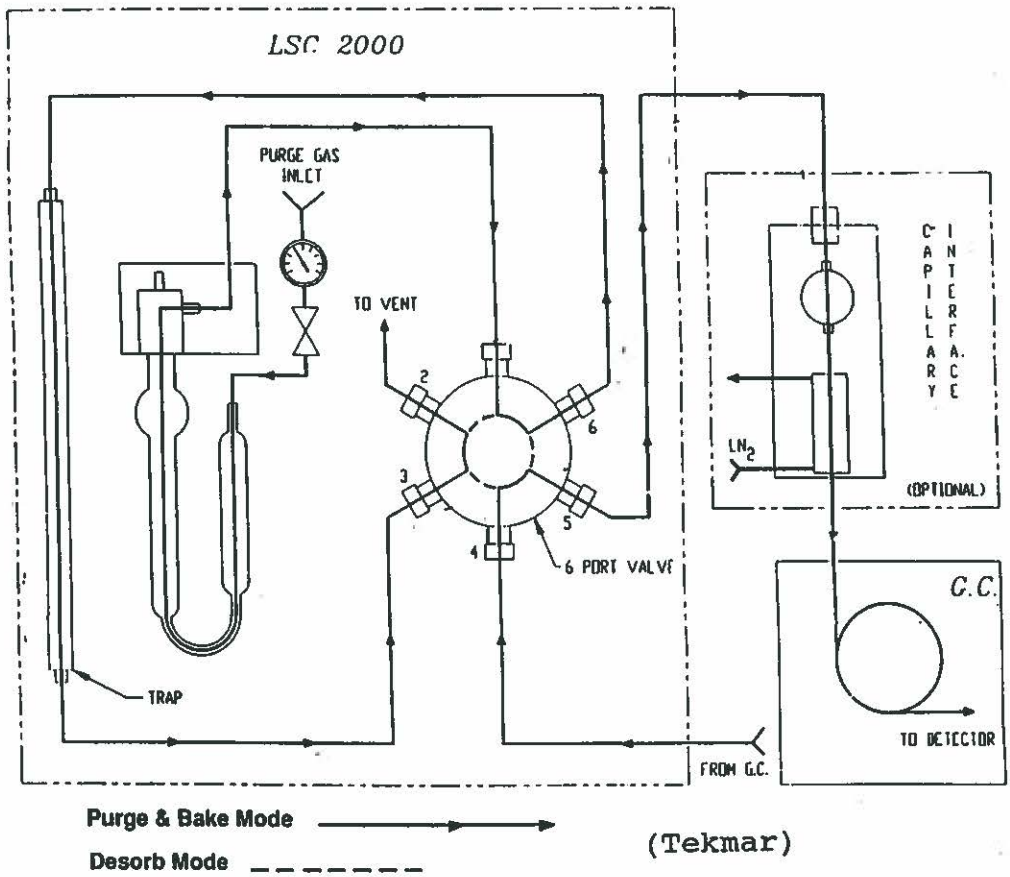


Figure 7 : **Système d'analyse de composés volatils par sorption/désorption ("Purge and Trap").**



1.3 Récupération et concentration des composés volatils

Les composés volatils générés ont été conservés à l'intérieur du montage (figure 7) jusqu'à leur récupération par un système d'adsorption-désorption (Tekmar ALS-2016 et LSC-2000, Cincinatti, É.U.) (figure 7). Ce système comporte un échantillonneur automatique (ALS-2016) qui purge les composés volatils à l'aide d'hélium jusqu'à l'unité maître (LSC-2000). Le LSC-2000 permet de programmer les conditions de purge du montage et de désorption des composés volatils après leur fixation à la trappe adsorbante. La trappe adsorbante utilisée (Vocarb^{MC} 4000, Supelco Inc., Bellefonte, É.U.) est constituée de trois matériaux et peut adsorber un large spectre de composés volatils. La programmation du LSC-2000 pour nos expériences était la suivante: 1) chauffage de l'échantillon: 70°C / 5 minutes, 2) purge et adsorption: température pièce / 12 minutes, 3) désorption: 150°C / 6 minutes, 4) chauffage des conduites et des valves : 175°C.

1.4 Chromatographie

La chromatographie en phase gazeuse (GC) du mélange de composés volatils provenant du PEBD a été complétée à l'aide de deux chromatographes différents.

1.4.1 GC-MS

Un chromatographe en phase gazeuse couplé à un spectromètre de masse (Hewlett-Packard GCD-G1800A, Arondale, É.U.) et équipé

d'une colonne capillaire (DB-5, J&W Scientific, Folsom, É.U) a été utilisé. Les conditions de chromatographie étaient les suivantes: 1) température initiale: -30°C, temps de rétention: 6,2 minutes, 2) température intermédiaire: 35°C, taux d'élévation de la température: 50°C/minute, temps de rétention: 4 minutes, 3) température finale: 225°C, taux d'élévation de la température: 7°C/ minute, temps de rétention: 1,36 minute, 4) temps total: 40 minutes.

Les fragmentogrammes obtenus par le spectromètre de masse pour chaque composé séparé par le chromatographe ont été analysés par le logiciel HPChem (Hewlett-Packard). Ce logiciel permet de comparer de façon automatisée le fragmentogramme associé à chaque substance séparée, à ceux d'une banque de plus de 70000 composés chimiques connus. Par la suite, les rapports d'analyses fourni par le logiciel ont été analysés manuellement et les composés affichant un coefficient de corrélation de plus de 90% ont été retenus.

En consultant le rapport d'analyse du logiciel, on peut observer pour chaque pic du chromatogramme ce qui suit:

Pk#	RT	Area%	Library/ID	Ref#	CAS#	Qual
63	10.35	0.27	C:\DATABASE\NBS75K.L			
			Nonane	65144	000111-84-2	95
			1-Octanol, 2-butyl-	69110	003913-02-8	59
			Heptane, 2,6-dimethyl-	65137	001072-05-5	50

La première ligne indique le temps de rétention du composé (ex: 10,35) et sa surface relative (ex: 0,27). Les lignes 2,

3 et 4 affichent les produits possédant le fragmentogramme le plus fidèle au fragmentogramme expérimental, en indiquant un coefficient de corrélation de 0 à 100%. Lorsque 2 composés possèdent des temps de rétention similaires ou qu'un composé présente un coefficient plus faible que 90%, la moyenne du signal de la région la plus pure du pic de chaque substance (généralement le centre) doit être effectuée. Dans notre cas, lorsque le coefficient de corrélation ne s'améliorait pas, les pics demeuraient sans identification.

Les échantillons de PEBD de 1 an et de 10 ans ont été analysés en duplicata aux doses d'irradiation de 0, 0,25 et 5 kGy. A partir de ces résultats, l'abondance moyenne de chaque composé identifié a été calculée. La précision du détecteur était cependant très variable et pouvait atteindre jusqu'à 50%.

1.4.2 GC-FID

La chromatographie par GC-FID, utilisée lors des analyses préliminaires, a permis de confirmer la présence de composés volatils provenant du polyéthylène à basse dose d'irradiation et d'identifier les principaux pics obtenus. Ce n'est qu'une fois disponible que le GC-MS a permis de confirmer les résultats déjà acquis par GC-FID et d'augmenter le nombre de substances identifiées.

Le GC-FID (Varian 3400, Walnut Creek, É.U.), équipé d'une colonne capillaire DB-5, était couplé à un détecteur à

ionisation à flamme. Les conditions de chromatographie étaient les mêmes que le GC-MS. Les pics de concentration majeure ont été identifiés par comparaison avec des standards externes chromatographiés dans les mêmes conditions (tableau 13, en annexe).

2.0 ANALYSE DES MICROORGANISMES IRRADIÉS EN PRÉSENCE DU PEBD

2.1 Essais préliminaires

Le but de notre expérience était d'exposer des microorganismes aux composés volatils générés par le matériel d'emballage irradié. Plusieurs essais préliminaires ont été tentés pour isoler le mélange gazeux généré, mais sans succès. Une chambre d'acier inoxydable étanche a été conçue pour conserver les composés volatils produits en grande concentration à partir de plusieurs mètres carrés de PEBD. Le soutirage des composés volatils était effectué à l'aide d'une conduite branchée à une jarre sous vide partiel, contenant les microorganismes.

Les microorganismes exposés à ces traitements ne semblaient pas être affectés. Nous n'avions, cependant, aucun moyen de confirmer quelle proportion des composés volatils était transférée en présence des microorganismes.

2.2 Définition des modèles d'étude et des traitements

2.2.1 Modèles d'étude

Deux autres modèles d'étude, plus fidèles à la réalité, ont été développés. Ces modèles permettaient d'exposer les microorganismes aux composés volatils tout en étant irradiés. La différence entre ces deux modèles était la variation du ratio de PEBD en fonction du volume d'air du contenant.

Le premier modèle a été mis au point afin d'imiter un aliment emballé. L'aliment a été remplacé par une boîte de Petri de verre (inerte à l'irradiation) contenant un milieu solide riche. Les boîtes de Petri ont été inoculées avec 3 cultures microbiennes pures (1 culture / expérience) et emballées sans couvercle dans des sachets hermétiques de PEBD. Le rapport de la surface interne totale du sachet sur son volume était de 2,0 cm^2/ml (figure 8).

Le deuxième modèle d'étude était constitué d'une chambre cylindrique d'acier inoxydable de deux litres contenant les boîtes de Petri de verre inoculées et environ 53 g de PEBD permettant d'obtenir un ratio plastique/volume de 20 cm^2/ml (figure 9). La chambre d'acier inoxydable était fermée hermétiquement à l'aide d'un scellant résistant à l'irradiation.

Figure 8 : **Modèle d'étude 1 : Sachet de PEBD**

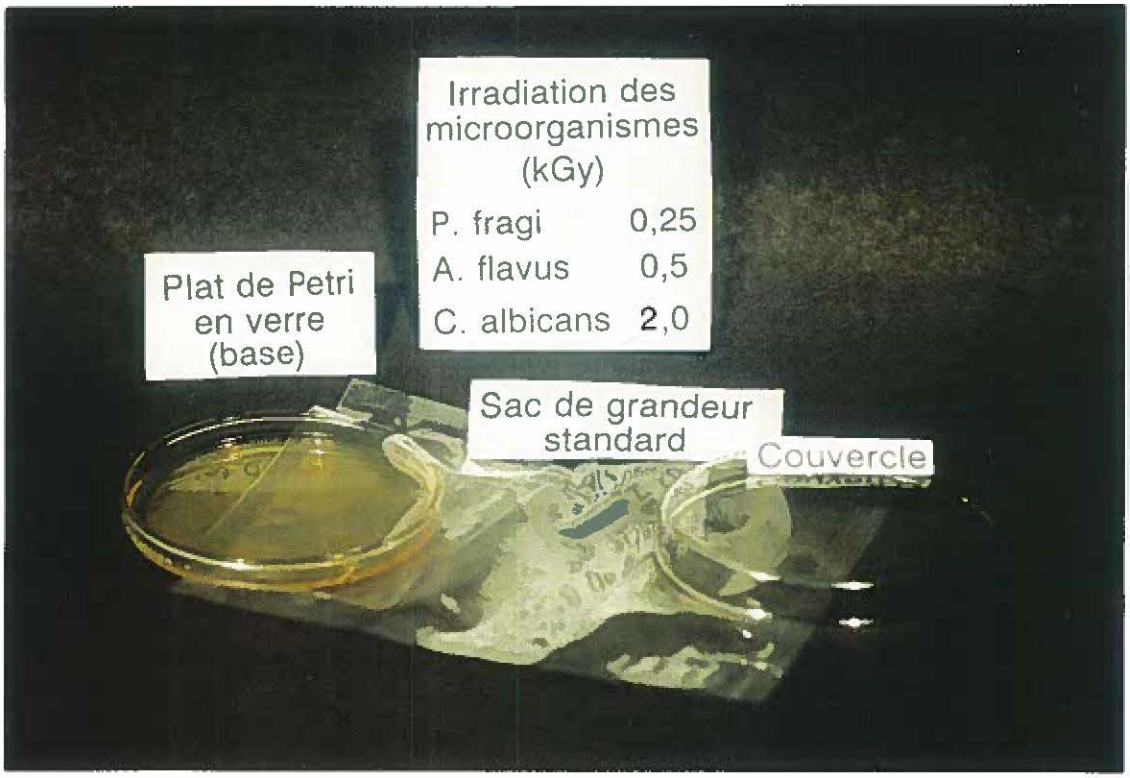
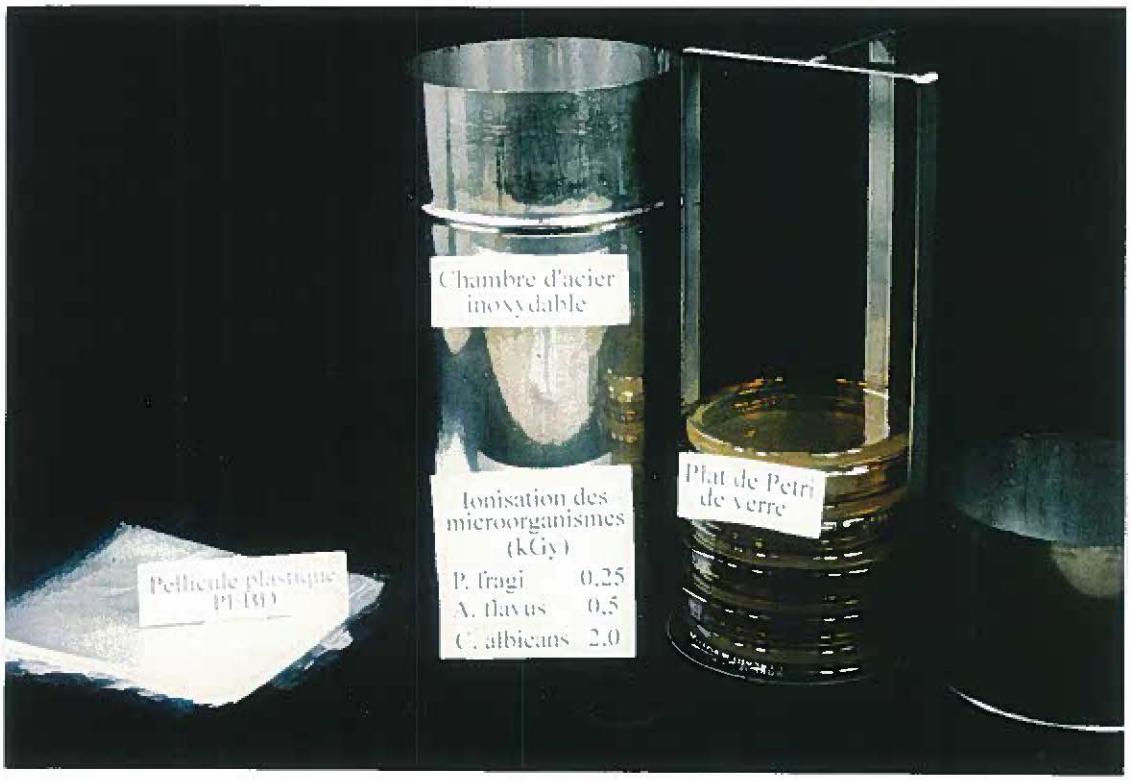


Figure 9 : **Modèle d'étude 2: Cylindre d'acier inoxydable contenant le PEBD**



2.2.2 Traitements

Quatre traitements ont été appliqués afin de vérifier l'effet de l'irradiation associée aux composés volatils provenant du PEBD. Il s'agissait des microorganismes 1) irradiés en présence de PEBD, 2) irradiés sans PEBD, 3) sans aucune irradiation avec PEBD et 4) sans aucune irradiation et sans PEBD. Les deux premiers traitements nous permettent de mesurer l'action isolée des composés volatils générés par le PEBD. Toutefois, il est connu qu'un milieu de culture irradié peut aussi produire des composés volatils et que les microorganismes en croissance libèrent également des substances volatiles. L'expérience en cours ne nous permet pas de vérifier si les composés volatils de ces deux provenances ont un effet sur le taux de survie à l'irradiation. On peut supposer toutefois que leur incidence s'annule entre le premier et le deuxième traitement. La toxicité des milieux de culture irradiés a tout de même été vérifiée sur les 3 microorganismes à l'étude. Cette information est présentée avec les résultats à la section 2.3.

Pour le premier modèle d'étude, l'emballage des boîtes de Petri d'un sachet de PEBD pouvait causer une hausse de l'humidité de l'air à l'intérieur du sachet par rapport au boîtes de Petri sans emballage. Pour vérifier que les différences d'humidité n'étaient pas à l'origine de variations des comptes microbiens entre les traitements, un cinquième traitement était nécessaire. Il s'agissait d'une boîte de Petri irradiée et

emballée immédiatement après irradiation. Ce dernier traitement permettait de vérifier quel était l'effet de l'humidité sans la présence de composés volatils générés par irradiation. Ce contrôle ne s'appliquait pas au deuxième modèle d'étude.

2.3 Préparation du matériel

2.3.1 Boîtes de Petri

Un milieu de culture à base d'infusion de coeur et de cervelle de boeuf (BBL^{MC}, Becton-Dickinson, Cockeysville, É.U.) a été employé pour les expériences d'irradiation.

2.3.2 Emballage plastique

Pour le premier modèle d'étude, le film plastique était tranché en lisières de 17 cm, ensuite repliées sur elles-mêmes et scellées à la chaleur de chaque côté pour laisser une ouverture suffisamment grande (12 à 14 cm) pour loger une base de boîte de Petri. Une fois la base inoculée, l'ouverture du sachet était scellée ("scelleuse" Quik Seal type 210B-1, National Instrument Co. Inc., Baltimore, É.U).

Pour le deuxième modèle d'étude, une longueur de 6,3 m de PEBD était découpée en plus petites feuilles (13 cm^2) pour permettre le remplissage d'une partie du volume de la chambre d'acier inoxydable.

2.4 Incubation des souches microbiennes

2.4.1 *Pseudomomas fragi* ATCC 27363

La bactérie *Pseudomonas fragi* est un microorganisme à croissance rapide (temps de génération de 20 à 30 minutes), un inoculum dilué par 10^4 a donc été utilisé pour obtenir après 16 à 17 heures des cellules en phase exponentielle. La culture était agitée à 150 rpm à la température de la pièce (25 ± 2°C). L'identification de la phase exponentielle a été complétée à l'aide d'une courbe de croissance établie à partir de comptes sur plaque d'unités viables et de lectures par spectrophotométrie à 490 nm (Davis et al., 1980). La densité optique d'une culture de *Pseudomonas fragi* en phase exponentielle était d'environ 1,0 (PU-8620 UV/VIS Spectrophotometer, Phillips Analytical, Cambridge, Angletterre).

Le choix d'une culture microbienne en phase exponentielle vient du fait qu'à ce stade, les microorganismes sont plus sensibles au traitement d'irradiation et aux composés bactéricides (Davis et al., 1980). De plus, en phase exponentielle, les propriétés et la composition des cellules sont constantes (Cooper, 1991). Cela constitue donc une façon plus exacte (Brock et Madigan, 1988) de mesurer l'effet possible de substances volatiles générées par l'irradiation des polymères.

2.4.2 *Candida albicans* ATCC 10231

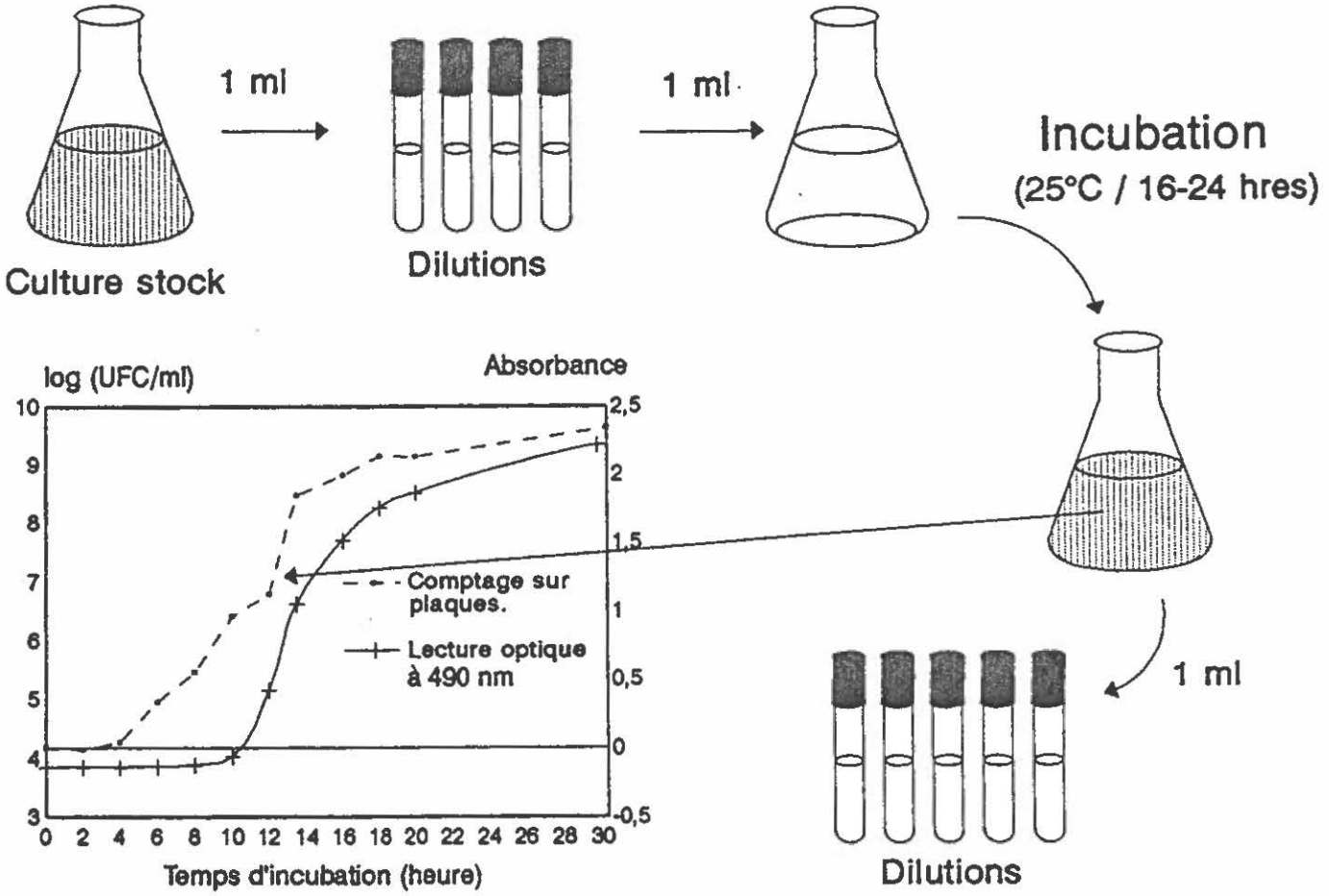
Cette levure est un microorganisme à croissance moins rapide que *P. fragi*. La phase exponentielle de *C. albicans* était atteinte après 19 à 24 heures suite à une dilution par 10^3 de l'inoculum. Les conditions de température et d'agitation étaient les mêmes que *P. fragi*. La densité optique choisie pour *C. albicans* était d'environ 0,5. Le résumé schématique du démarrage des cultures de *P. fragi* et de *C. albicans* apparaît à la figure 10.

2.4.3 *Aspergillus flavus* ATCC 28532

Il est important d'utiliser les cellules végétatives de cette moisissure pour obtenir une plus grande radiosensibilité (Saleh et al., 1988). Grecz et al. (1983) le soulignent en indiquant que la faible radiorésistance d'une cellule est grandement associée à un contenu en eau plus élevé. Ce phénomène pourrait sensibiliser davantage les cellules végétatives aux composés chimiques.

L'inoculum d'*Aspergillus flavus* nécessaire à l'expérience d'irradiation a été préparé à partir de conidies dont la germination a été provoquée. Quelques heures étaient nécessaires afin de produire un tube germinatif à partir des conidies pour obtenir de jeunes cellules végétatives. Il s'agissait en premier lieu de récolter les conidies produites

Figure 10 : **Démarrage des cultures *Pseudomonas fragi* et *Candida albicans***



après leur production par *A. flavus* sur le milieu Soya agar (Hobbs, 1989) à température ambiante pendant 6 jours sous luminosité constante. La lumière semblait accélérer la maturation des conidies du jaune au vert (Griffin, 1981). A l'aide d'une solution d'agent mouillant (TWEEN 80, Sigma Chemical Co., St-Louis, É.U.) à 0,5% (p/p), les conidies étaient immergées dans la boîte de Petri et le liquide était agité pour détacher le maximum de conidies donnant une solution verte et opaque. La technique de germination des conidies a été mise au point en combinant les méthodes de Smith (1981) et d'Anderson et Smith (1972). Cette technique se résume à la germination synchronisée de conidies suivie d'une période d'incubation à 35°C de 6 heures en bouillon nutritif (DIFCO^{MC}, Difco Laboratories, Détroit, É.U). Les conidies doivent être préalablement lavées et centrifugées 2 fois (1500 G pendant 10 minutes) dans l'eau osmosée stérile afin d'enlever certaines substances de la solution inhibant la germination des conidies. La concentration des conidies dans le bouillon à cette étape, évaluée par hémacymètre (Levy Ultra-plane, C.A. Hausser and Son, Philadelphie, É.U.) est d'environ 1 à $5x10^6$ conidies/ml. Après incubation, 80 à 90% des conidies forment un ou deux tubes germinatifs, ce qui est déterminé par une évaluation visuelle de dix à quinze champs au microscope photonique avec le grossissement 40x. Après plusieurs heures d'incubation, les petits hyphes ont tendance à s'agréger pour former des amas de plusieurs dizaines. Il faut donc briser les amas à l'aide d'un mélangeur

(Stomacher Lab Blender 80, Seward Medical UAC House, Londres, Angleterre) pendant 5 minutes. Un résumé schématique est présenté à la figure 11.

2.5 Choix des doses d'irradiation

En se basant sur la littérature, une gamme de doses d'irradiation ont été administrées à chaque microorganisme. L'objectif de cette procédure était de déterminer la dose produisant un maximum de composés volatils à partir du PEBD sans détruire la totalité des microorganismes pour en mesurer la survie à l'irradiation en présence ou non des composés volatils.

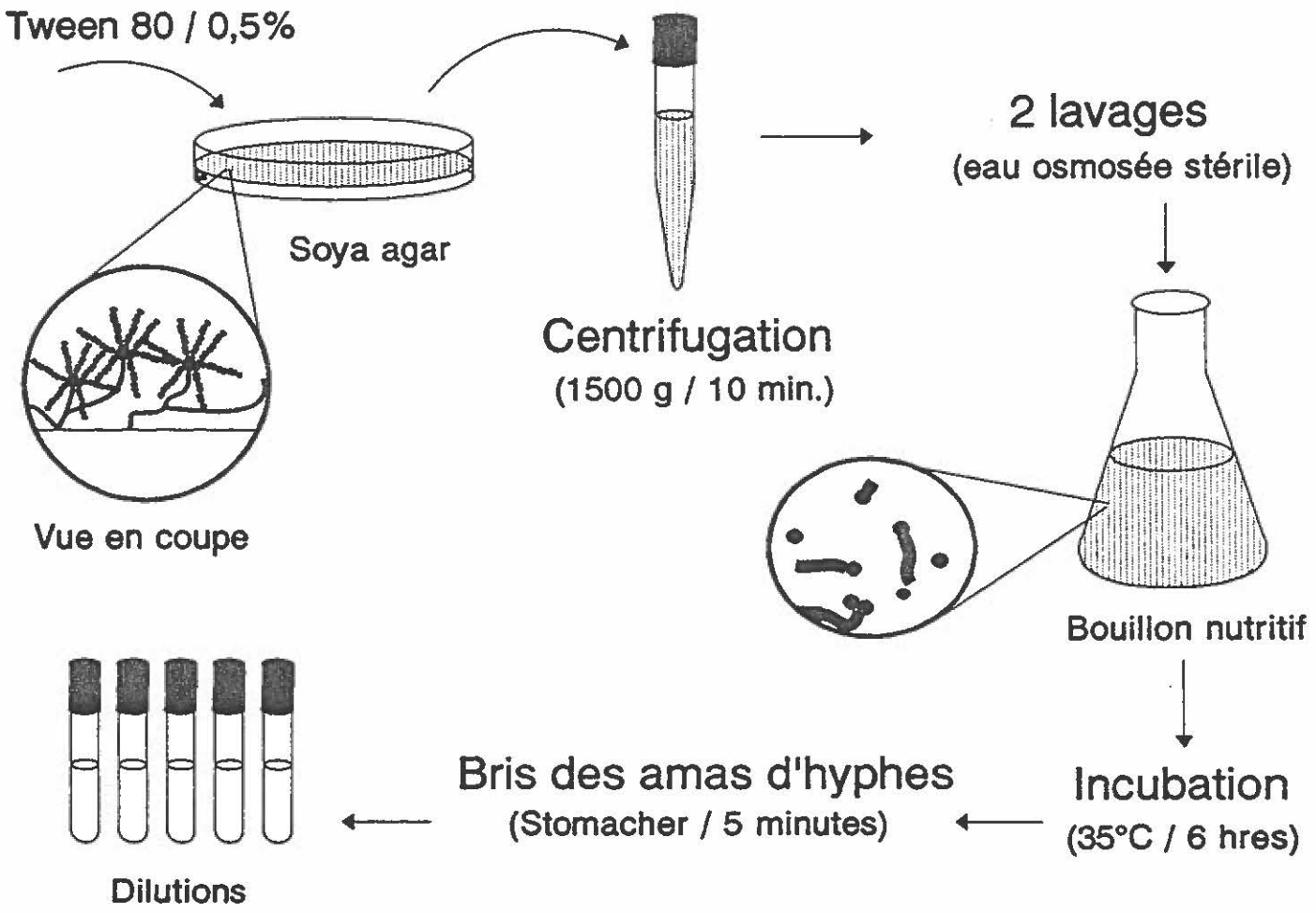
La façon de choisir la dose optimale fut d'inoculer des boîtes de Petri avec plusieurs dilutions et de les irradier à différentes doses. La dose présentant le rapport de la population finale sur la population initiale le plus faible a été sélectionnée.

Ainsi pour *Pseudomonas fragi*, une dose de 0,25 kGy était nécessaire pour une réduction suffisante. *Candida albicans*, plus résistante à l'irradiation, a été irradiée à 2 kGy et *Aspergillus flavus* nécessitait une dose de 0,5 kGy.

2.6 Dilutions et inoculations sur boîtes de Petri

Les dilutions des cultures en phase exponentielle ont été sélectionnées pour obtenir un nombre de colonies microbiennes se rapprochant de 30 à 300 UFC par boîte de Petri avant et

Figure 11 : **Démarrage de la culture d'*Aspergillus flavus***



après irradiation. Cinq (5) boîtes de Petri étaient inoculées par traitement et chaque traitement était répété au moins 5 fois.

Pour *Pseudomonas fragi*, le facteur de dilution de la culture nécessaire pour l'inoculation des boîtes de Petri irradiées était de 10^2 et de 10^7 pour les boîtes n'ayant pas subi d'irradiation.

Pour *Candida albicans*, le facteur de dilution de la culture était de 10^2 pour les boîtes irradiées et de 10^5 pour les boîtes sans irradiation.

Les dilutions d'hyphes d'*Aspergillus flavus* étaient beaucoup plus faibles que la quantité de conidies évaluée avant germination. Le facteur de dilution était de 10^2 pour les boîtes de Petri irradiées et de 10^3 pour les boîtes non-irradiées. Il faut noter qu'habituellement les conidies de moisissures n'atteignaient pas toutes le stade végétatif. Deuxièmement, plusieurs cellules d'hyphes pouvaient être détruites par le "Stomacher" et les amas n'étaient pas toujours complètement brisés par ce mélangeur. Le taux final de formation de thalles sur gélose était d'environ 10% de la concentration initiale de conidies.

2.7 Irradiation

2.7.1 Modèle d'étude 1

L'irradiation de *Pseudomonas fragi* et d'*Aspergillus flavus* fut complétée dans le GAMMACELL 220 (Nordion International inc, Kanata, Canada) de l'Institut Armand-Frappier de Laval à un débit de la dose d'irradiation de 0,6 kGy/h. *Candida albicans* a été irradié dans le GAMMACELL 220 du Centre d'Irradiation du Canada de Laval à un débit de la dose de 1,9 kGy/h.

Les temps d'irradiations des deux GAMMACELL 220 ont été établis grâce à un programme informatique basé sur la décroissance du débit initial de la dose d'irradiation en fonction du temps. La distribution de la dose à travers un même échantillon a été vérifiée à l'aide de deux types de dosimètres: Gammachrome YR / 0,1 à 0,3 kGy (AERE-Harwell Laboratories, Didcot, Angleterre) et Ceric-cerous/ 0,6 à 10 kGy (Nordion International inc, Kanata, Canada). Afin de minimiser les variations des comptes microbiens, puisque la dose d'irradiation variait de 20% (courbes isodoses en annexe) aux extrémités de la chambre, seulement le centre de la chambre a été utilisé; les 5 boîtes de Petri étant placées sur un socle.

2.7.2 Modèle d'étude 2

Étant donné que les échantillons de ce deuxième modèle étaient plus volumineux, l'irradiation a été complétée à l'aide du GAMMABEAM 651 PT (Nordion International inc, Canada) au

Centre de recherche et développement sur les aliments d'Agriculture et Agroalimentaire Canada.

Les doses d'irradiation appliquées étaient les mêmes qu'avec le premier modèle. *Pseudomonas fragi* et *Aspergillus flavus* ont été irradiés à un débit de la dose d'irradiation de 0,7 kGy/h et *Candida albicans* fut irradié à un débit de la dose de 1,7 kGy/h. La faible variation du débit de la dose observée entre le GAMMACELL 220 et le GAMMABEAM 651 PT n'affecterait ni les microorganismes (Dion et al. 1994), ni le plastique (Taub et al., 1979). Les temps d'irradiation et la distribution de la dose ont été évalués à l'aide des dosimètres Ceric-cerous.

2.8 Incubation

L'incubation des 3 microorganismes, une fois mis en plaques, a été effectuée à la température de la pièce (25-26°C).

2.9 Tests biochimiques et évaluation visuelle

Des tests biochimiques ont été employés pour vérifier si le traitement d'irradiation, en combinaison avec les composés volatils générés par le PEBD, pouvait entraîner la mutation de voies métaboliques sur deux des trois microorganismes à l'étude.

La plupart des caractéristiques biochimiques particulières aux microorganismes utilisés ont été relevées dans la littérature. Les tests associés au métabolisme de *Pseudomonas fragi*

ont été identifiés très tôt par Hussong et al. (1937) et Nashif et Nelson (1953), tel que l'indique Breed et al. (1957):

- Coagulation et décarboxylation des protéines laitières, fermentation du glucose et lactose.
- Hydrolyse de la matière grasse.
- Fermentation du glucose et du galactose.

Trois réactions ont été identifiées à l'aide de plaquettes du système d'identification de bactéries BiologMicrostation^{MC} (Hayward, États-Unis) soit: l'utilisation du citrate, la fermentation du mannose et du maltose. Un test de résistance à l'indicateur Vert brillant a été utilisé à la suite d'essais exploratoires.

Pour *Candida albicans*, des tests de fermentation des sucres, recommandés pour l'identification des levures (Soltys, 1963), ont été employés. Les sucres fermentés par *Candida albicans* étaient le glucose, le saccharose, le maltose, le galactose et le fructose. Le lactose a aussi été employé mais n'était pas fermenté par la levure. Des essais de fermentation avec le mannose et le tréhalose donnaient des réactions positives.

De 500 à 800 colonies par traitement pour *P. fragi* et 1000 par traitement pour *C. albicans* ont été criblées dans le but d'observer des variations du système enzymatique. Ces colonies ont été prélevées sur les boîtes de Petri de chaque traitement et ont été repiquées sur milieu "Brain heart infusion"(BHI) avec agar à l'aide de cure-dents stériles. Ce repiquage

permettait de rassembler les colonies sur un nombre réduit de boîtes de Petri et de s'assurer de la stabilité des mutations lorsqu'elles étaient décelées par les tests biochimiques subséquents. Suite à cette régénération sur BHI, les colonies ont été transférées avec un velours stérile sur huit boîtes de Petri contenant chacune 1 test biochimique différent (figure 12). Les modifications apportées à la composition et la technique de fabrication de certains milieux employés pour les tests biochimiques ont été détaillées en annexe.

Pour *Aspergillus flavus*, l'étude de l'activité biochimique étant plus fastidieuse, seulement les caractères physiques (formes, couleur et revers de thalles) ont été observés après incubation.

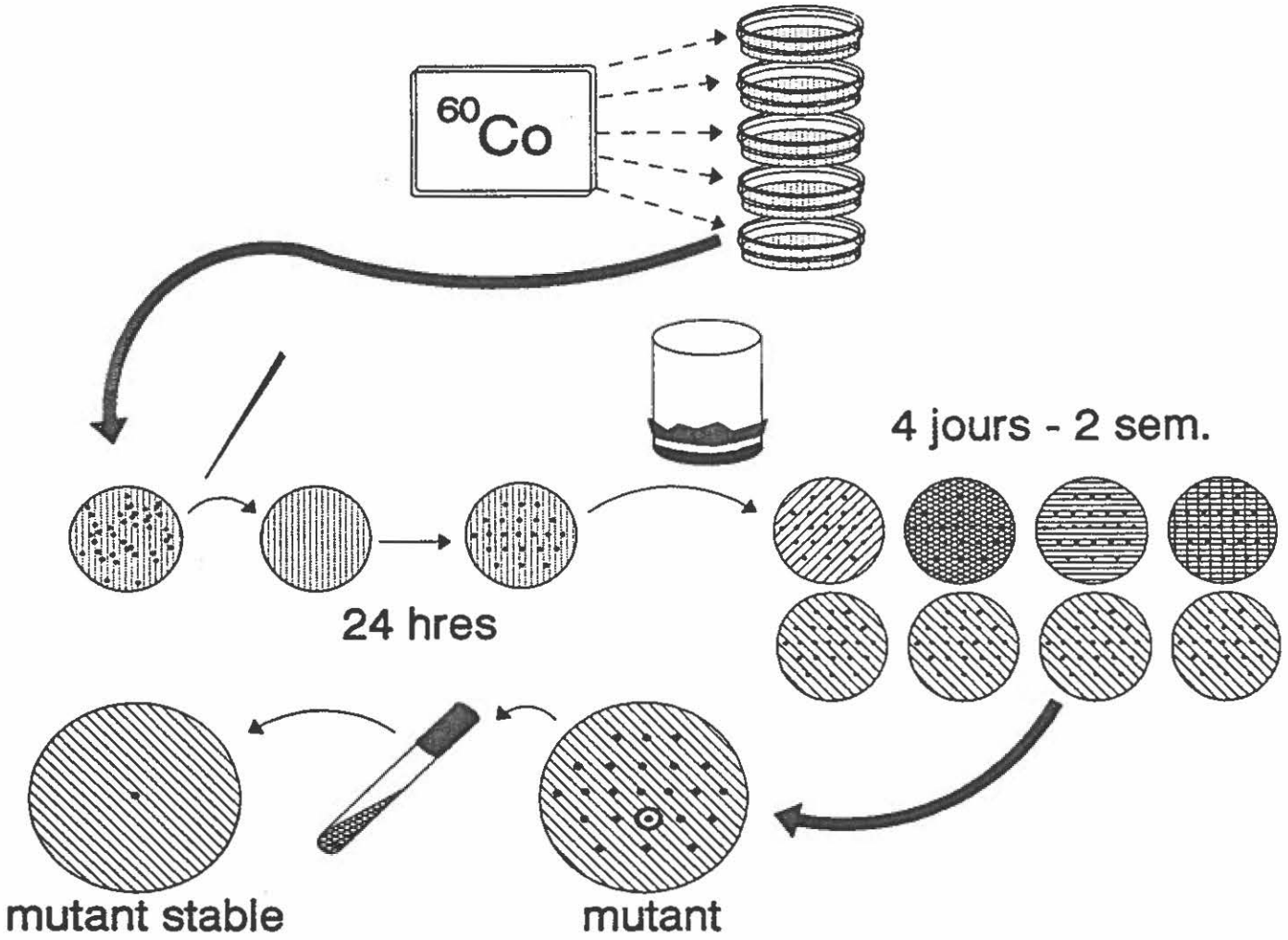
2.10 Analyse statistique

Une analyse de variance a été complétée dans le but de vérifier si l'effet des composés volatils sur le taux de survie des microorganismes était significatif. Elle a été réalisée selon le modèle statistique suivant:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$$

où Y_{ij} est l'observation associée au ième traitement mesurée à la jème répétition, μ est la moyenne générale des observations, τ_i est l'effet du ième traitement, β_j est l'effet de la jème répétition et ϵ_{ij} étant un terme d'erreur aléatoire. L'analyse

Figure 12 : **Application des tests biochimiques pour *Pseudomonas fragi* et *Candida albicans***



de variance des observations microbiologiques pour le premier modèle d'étude a été complétée par logiciel SAS (SAS Institute, Carry, États-Unis) et par le logiciel GENSTAT 5.1 (New Miracle Algorythm Group, Rothamsted, Angleterre) pour le deuxième modèle d'étude.

RÉSULTATS

1.0 ANALYSE DES COMPOSÉS VOLATILS GÉNÉRÉS PAR LE PEBD

1.1 Analyse chromatographique

1.1.1 Analyse qualitative par GC-MS

La chromatographie par GC-MS a permis de détecter les composés volatils générés par les deux polyéthylènes (1 et 10 ans) irradiés à 0, 0,25 et 5 kGy. Les chromatogrammes résultant de cette analyse sont présentés aux figures 13 et 14.

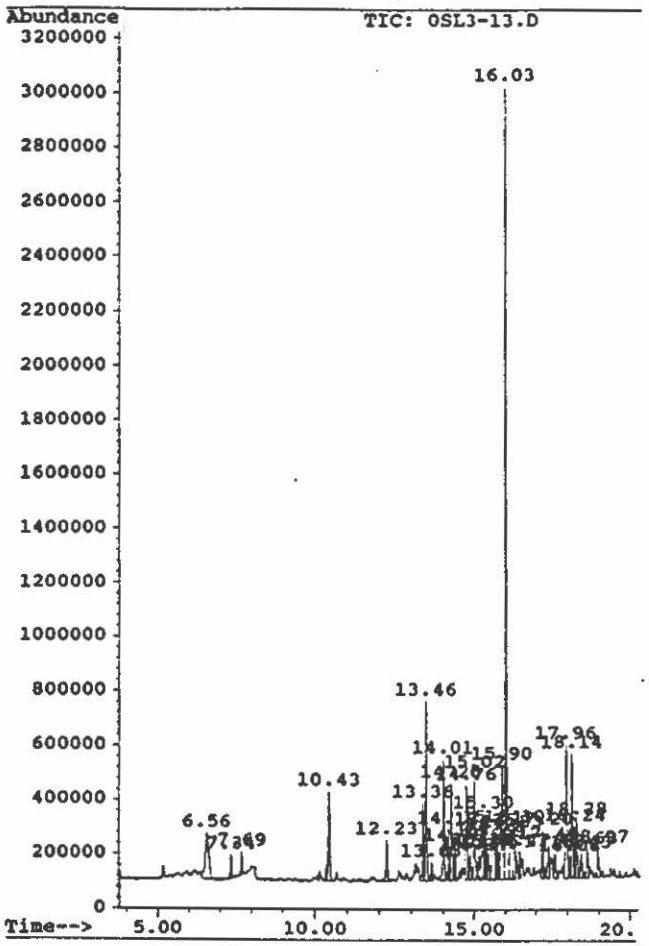
L'identification de trente-huit (38) composés organiques volatils a été effectuée. La liste des composés identifiés est retrouvée aux tableaux 6 et 7. Ces composés volatils sont répartis en six groupes soit: les aldéhydes, les cétones, les alcanes, les alcènes, les alcools et les dérivés benzéniques. Ces groupes sont décrits au tableau 8 et illustrés à la figure 15.

1.1.2 Analyse qualitative par GC-FID

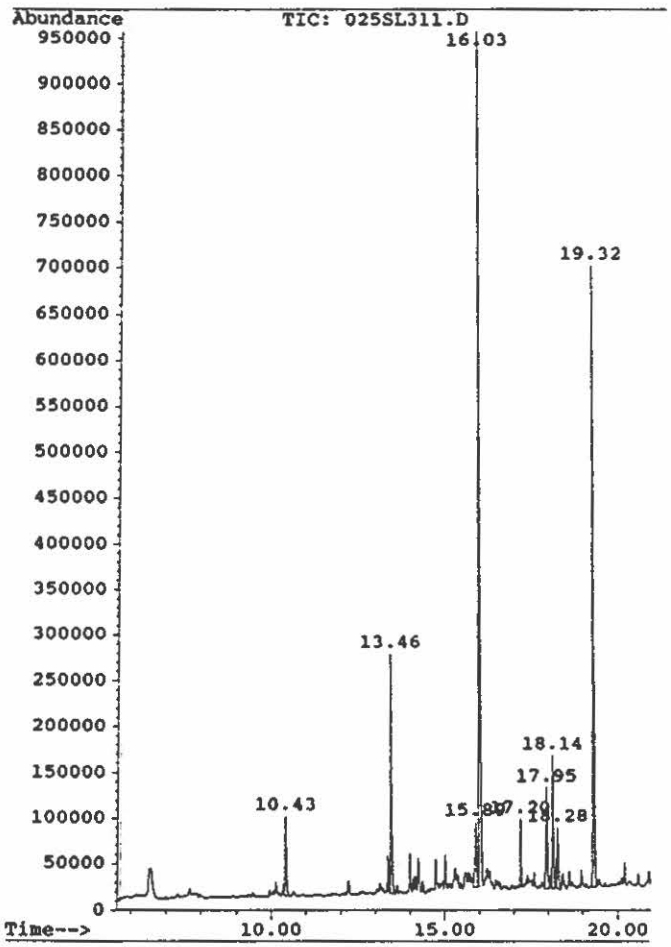
Les chromatogrammes des composés volatils générés par irradiation à 0, 0,25, 1 et 5 kGy pour le PEBD de 1 an d'existence, obtenus par GC-FID, sont présentés à la figure 16.

Treize (13) composés volatils ont été identifiés par ce type de chromatographie et sont présentés au tableau 9. Sept (7) des pics analysés sur les chromatogrammes possédaient une double identité. C'est-à-dire que pour chacun de ces pics,

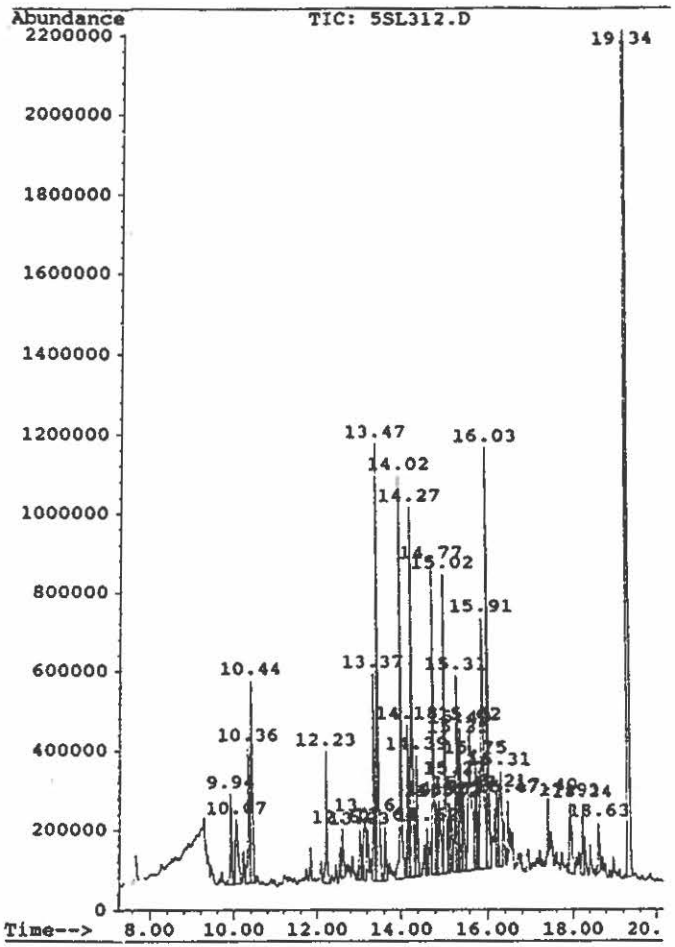
Figure 13 : Chromatographie (GC-MS) des composés volatils générés par le PEBD de 1 an irradié à 0, 0,25 et 5 kGy.



0 kGy

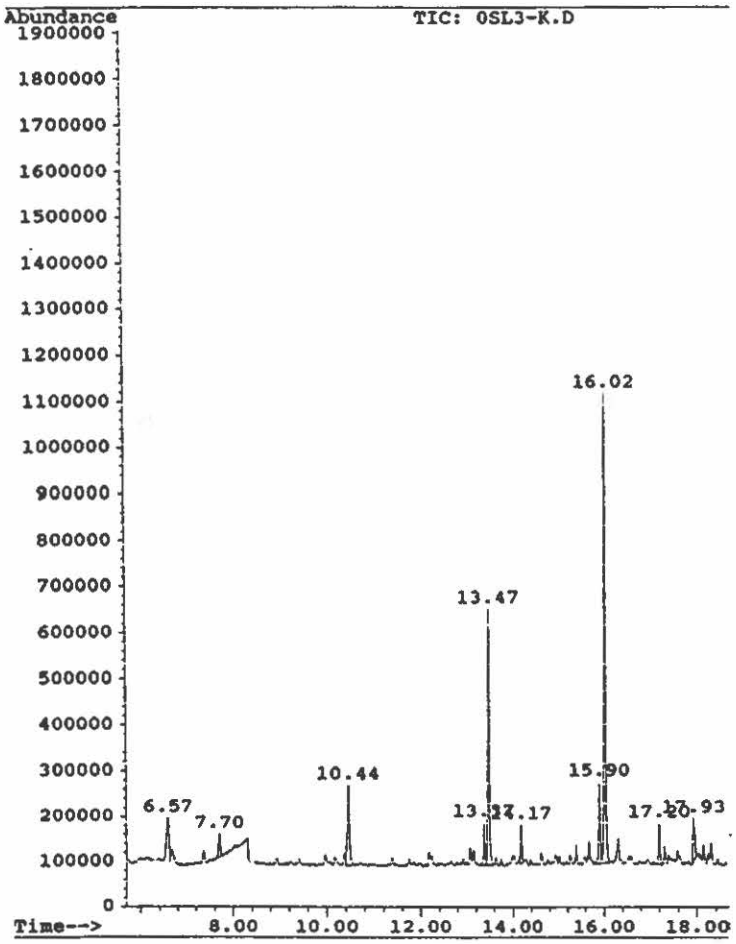


0,25 kGy

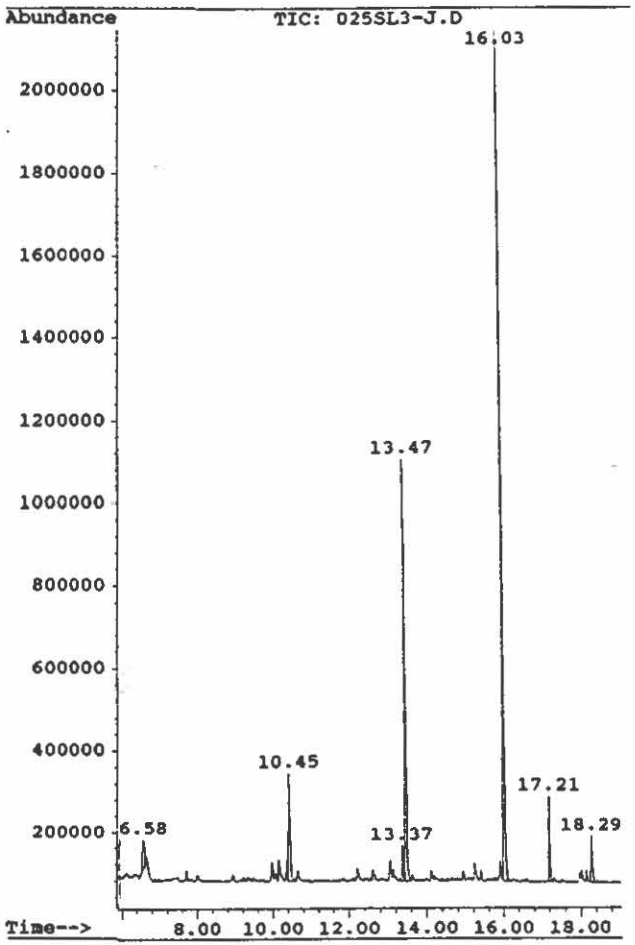


5 kGy

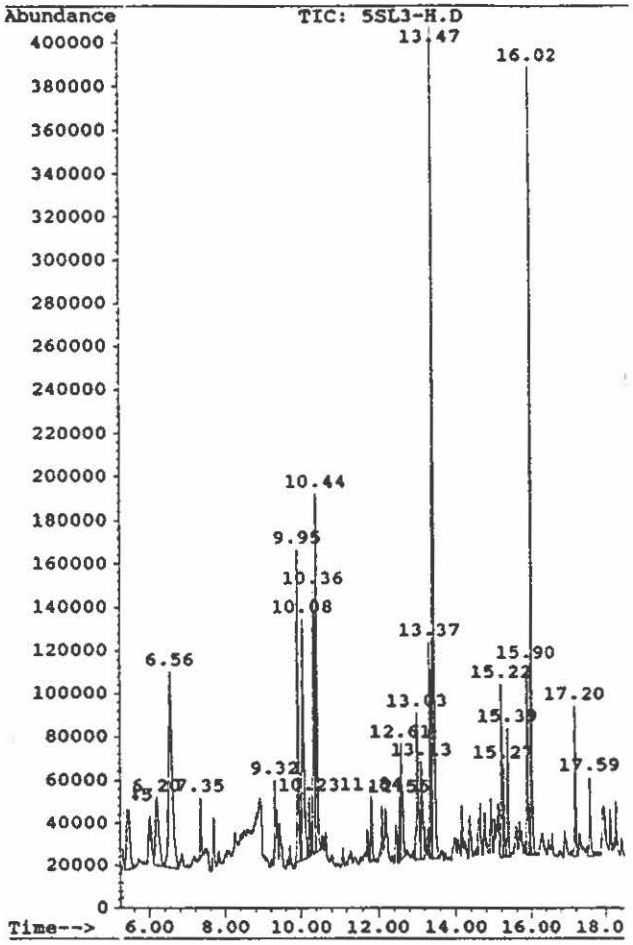
Figure 14 : Chromatographie (GC-MS) des composés volatils générés par le PEBD de 10 ans irradié à 0, 0,25 et 5 kGy.



0 kGy



0,25 kGy



5 kGy

Tableau 6 : **Composés volatils générés par le PEBD de 1 an irradié à 0, 0,25 et 5 kGy accompagnés de leur temps de rétention et de leur coefficient de corrélation obtenus par GC-MS.**

Composés volatils identifiés	0 kGy			0.25 kGy			5 kGy		
	TR *	Abondance	CC **	TR *	Abondance	CC **	TR *	Abondance	CC **
3-méthyl, heptane	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Octane	6.56	6,983,640	95	6.55	2,251,754	95	6.98	24,151,379	91
Hexanal	6.62	3,827,044	90	6.59	2,712,243	90	6.99	14,035,184	90
1-éthyl, cyclohexane	—	—	—	—	—	—	8.10	15,550,611	91
1-éthyl, benzène	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1,3-diméthyl, benzène / xylène	9.22	431,787	93	—	—	—	9.58	4,016,272	93
3-éthyl, heptane	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3-heptanone	—	—	—	—	—	—	10.30	8,305,147	91
4-nonène / 3-nonène	—	—	—	—	—	—	10.59	2,502,668	93
Nonane	10.36	1,083,932	95	10.35	820,379	95	10.54	9,262,266	95
Heptanal	10.44	6,820,372	93	10.43	4,900,301	96	10.80	20,390,773	92
Benzaldéhyde	—	—	—	—	—	—	12.52	4,412,183	94
3-éthyl, octane	—	—	—	—	—	—	12.78	1,631,054	90
3-méthyl, nonane	—	—	—	—	—	—	12.88	2,121,304	92
1-heptanol	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2-méthylpropyl, cyclohexane	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3-octanone	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6-méthyl, 5-heptène-2-one	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1-décène	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2-octanone	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Décane	13.37	5,110,146	96	13.36	2,460,216	96	13.68	7,297,839	94
4-décène	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Octanal	13.47	11,713,638	97	13.46	11,178,673	94	13.81	61,559,104	95
1,2 / 1,3-dichloro, benzène	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1-butyl, cyclohexane	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1-octanol	—	—	—	—	—	—	15.54	21,549,567	90
5-nonanone	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2-nonanone	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Undécane	15.90	13,337,136	93	15.89	7,092,178	92	—	—	—
Nonanal	16.03	44,679,994	96	16.04	50,937,428	96	16.37	118,804,510	94
1,7,7-triméthyl, bicyclo[2.2.1] heptane-2-one	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1-dodécène	17.96	13,353,864	95	17.97	6,009,439	96	—	—	—
2-décanone	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Dodécane	18.14	8,627,082	94	18.13	3,992,239	95	18.42	4,933,339	94
Décanal	—	—	—	18.28	4,980,343	91	18.57	6,952,549	92
1-hexyl, cyclohexane	19.48	2,041,949	91	—	—	—	—	—	—
1,3-di(tert-butyl), benzène	—	—	—	19.32	18,621,057	94	19.65	223,501,532	93
2-undécanone	—	—	—	20.11	820,007	91	—	—	—

* TR : Temps de rétention (minutes)
** CC : Coefficient de corrélation

Tableau 7 : **Composés volatils générés par le PEBD de 10 ans irradié à 0, 0,25 et 5 kGy accompagnés de leur temps de rétention et de leur coefficient de corrélation obtenus par GC-MS.**

Composés volatils identifiés	0 kGy			0.25 kGy			5 kGy		
	TR *	Abondance	CC **	TR *	Abondance	CC **	TR *	Abondance	CC **
3-méthyl, heptane	—	—	—	—	—	—	5.55	2,137,149	90
Octane	6.57	3,475,034	96	6.54	4,090,561	94	6.66	4,820,165	83
Hexanal	6.66	1,361,721	90	6.63	1,697,547	90	6.70	2,210,648	94
1-éthyl, cyclohexane	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1-éthyl, benzène	8.93	859,706	92	8.91	3,236,613	94	—	—	—
1,3-diméthyl, benzène / xylène	9.22	694,742	95	9.21	258,546	91	—	—	—
3-éthyl, heptane	—	—	—	—	—	—	9.21	1,614,579	91
3-heptanone	—	—	—	—	—	—	10.04	3,736,416	91
4-nonène / 3-nonène	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Nonane	10.36	681,115	94	10.35	1,031,529	94	10.45	3,239,713	95
Heptanal	10.44	4,828,837	94	10.43	5,897,128	93	10.53	5,192,274	97
Benzaldéhyde	—	—	—	12.19	1,627,255	93	12.28	1,546,855	91
3-éthyl, octane	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3-méthyl, nonane	—	—	—	—	—	—	12.64	715,890	91
1-heptanol	—	—	—	12.60	1,259,908	90	12.69	2,491,461	90
2-méthylpropyl, cyclohexane	12.92	903,925	92	—	—	—	—	—	—
3-octanone	—	—	—	—	—	—	13.11	2,573,198	91
6-méthyl, 5-heptène-2-one	13.06	1,371,840	92	13.04	1,500,156	94	—	—	—
1-décène	—	—	—	—	—	—	13.21	1,268,731	90
2-octanone	—	—	—	—	—	—	13.26	695,376	91
Décane	13.37	2,086,389	93	13.36	1,884,197	94	13.34	695,964	96
4-décène	—	—	—	—	—	—	13.45	2,295,991	94
Octanal	13.47	11,081,499	94	13.46	17,985,722	96	13.56	12,498,633	90
1,2 / 1,3-dichloro, benzène	13.63	772,731	97	13.62	668,663	97	—	—	—
1-butyl, cyclohexane	14.17	2,733,944	93	—	—	—	—	—	—
1-octanol	—	—	—	15.21	3,006,971	91	15.30	3,937,975	91
5-nonanone	—	—	—	—	—	—	15.34	1,400,567	91
2-nonanone	—	—	—	15.73	265,088	90	—	—	—
Undécane	—	—	—	15.89	2,768,261	90	—	—	—
Nonanal	16.02	20,937,518	96	16.02	37,930,805	96	16.10	13,211,540	97
1,7,7-triméthyl, bicyclo[2.2.1] heptane-2-one	—	—	—	16.97	666,577	97	—	—	—
1-dodécène	—	—	—	17.95	2,120,638	93	—	—	—
2-décanone	18.01	2,003,799	91	18.00	2,081,716	91	18.08	1,005,845	91
Dodécane	—	—	—	18.13	1,326,115	91	18.21	777,728	93
Décanal	18.29	2,656,554	89	18.28	4,170,256	91	18.36	1,600,394	91
1-hexyl, cyclohexane	18.97	1,237,969	91	18.96	384,270	91	—	—	—
1,3-di(tert-butyl), benzène	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2-undécanone	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* TR : Temps de rétention
** CC : Coefficient de corrélation

Figure 15 : **Visualisation, par groupe chimique, de l'abondance des composés volatils générés par le PEBD de 1 an et de 10 ans irradiés à 0, 0,25 et 5 kGy (GC-MS).**

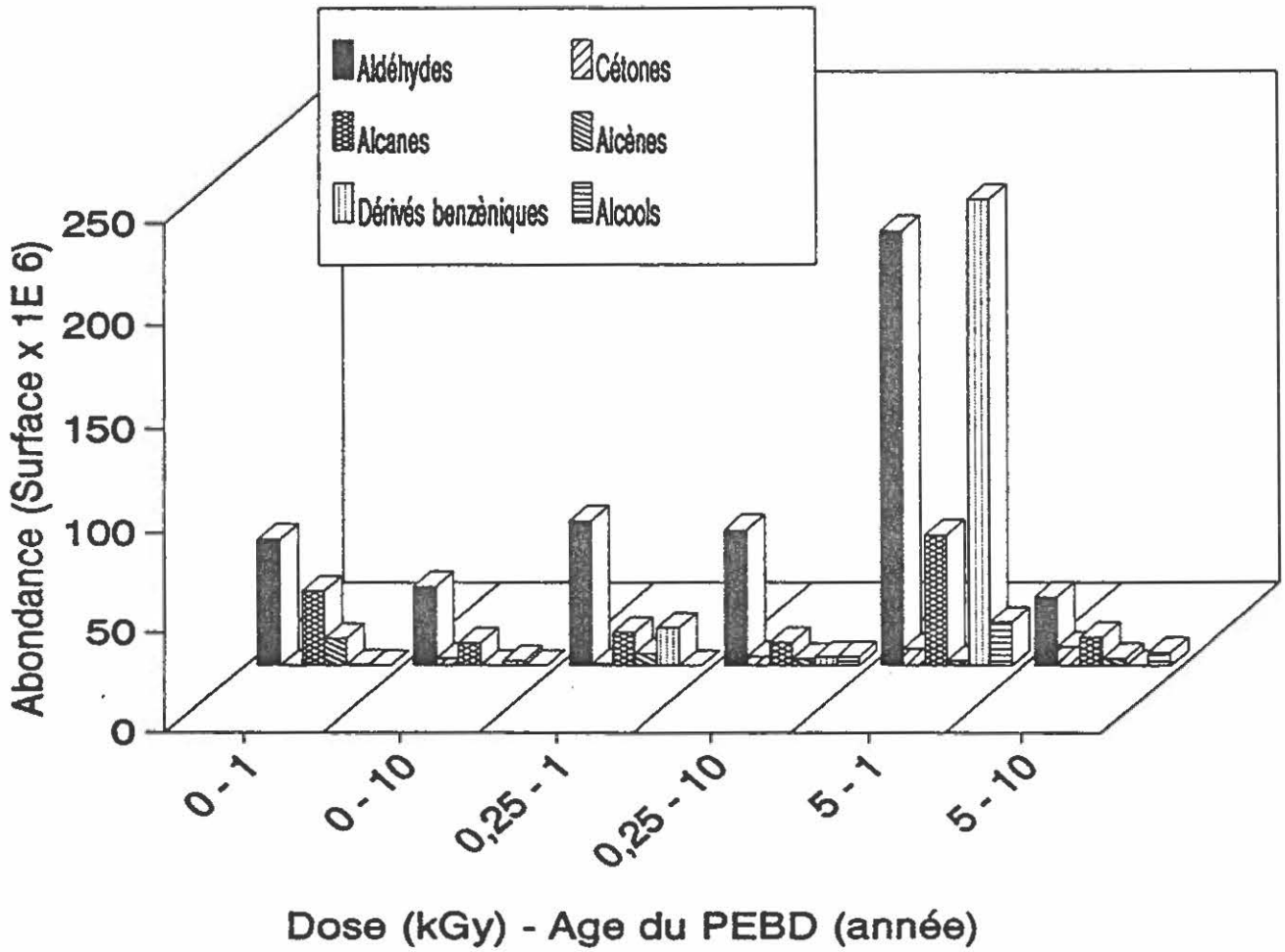


Tableau 8 : **Abondance, par groupe chimique, des composés volatils générés par le PEBD de 1 an et de 10 ans irradiés à 0, 0,25 et 5 kGy (GC-MS).**

	Abondance (surface)					
Groupe chimique	0 kGy (1 an)	0 kGy (10 ans)	0.25 kGy (1 an)	0.25 kGy (10 ans)	5 kGy (1 an)	5 kGy (10 ans)
Aldéhydes	63,214,004	39,504,408	71,996,745	67,611,166	212,119,119	34,049,696
Cétones	0	3,375,639	820,007	4,513,537	8,305,147	9,411,402
Alcanes	37,183,885	11,118,376	16,616,766	11,484,933	64,947,792	14,001,188
Alcènes	13,353,864	0	6,009,439	3,351,280	2,502,668	3,564,722
Dér. benzèniques	431,787	2,327,179	18,621,057	4,163,822	227,517,804	0
Alcools	0	0	0	4,266,879	21,549,567	6,429,436
Total:	114,183,540	56,325,602	114,064,014	95,391,617	536,942,097	67,456,444

Figure 16 : **Chromatographie (GC-FID) des composés volatils générés par le PEBD de 1 an irradié à 0, 0,25, 1 et 5 kGy.**

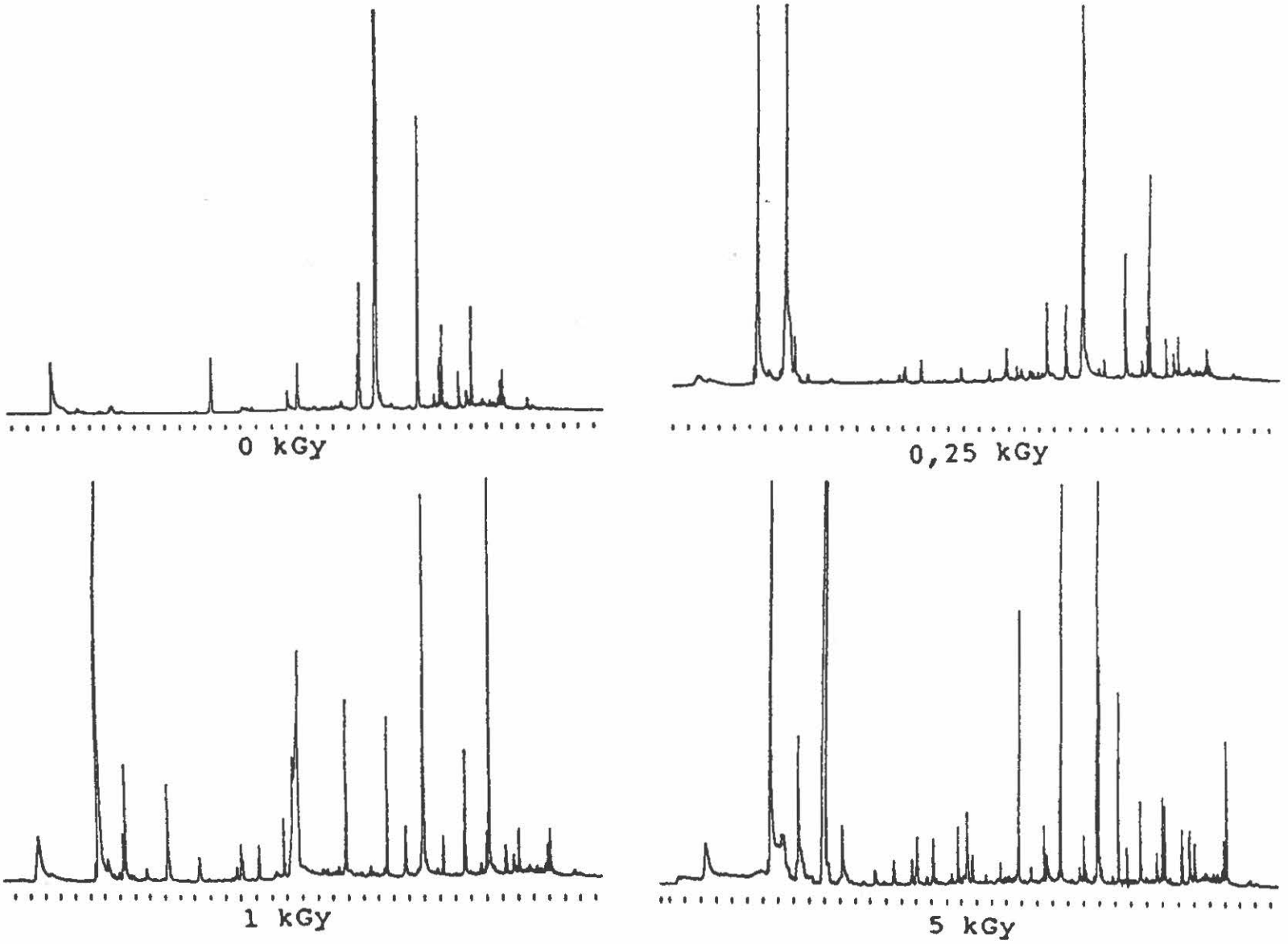


Tableau 9 : **Identification des composés volatils générés par le PEBD de 1 an irradié à 0 et 5 kGy (GC-FID).**

0 kGy

Composé	TR*	% relatif	Surface (mV)	0 vs 5 kGy
Butanal / 1-propanol	9,28	3,8	2515	
Pentanal	10,76	2	1254	+
Heptane	12,3	---	---	
Octane / hexanal	17,16	4,7	3101	
Décane / octanal	23,91	6,2	4030	
1-dodécène	28,69	---	---	+
Tétradécane / 1-tétradécène	33,12	4,8	3112	
Hexadécane	37,08	6,4	4171	

5 kGy

Composé	TR*	% relatif	Surface (mV)	0 vs 5 kGy
Butanal / 1-propanol	9,3	2,8	12009	
Heptane	12,28	2,7	11650	
Octane / hexanal	17,05	1,7	7561	
2-heptanone	20,25	1,5	6531	+
Nonane / heptanal	21,07	1	4172	+
Décane / octanal	23,79	0,4	1866	
Undécane / nonanal	26,5	5,4	22923	+
Dodécane	29,12	1,3	5742	+
Tridécane	31,05	---	---	+
Tétradécane / 1-tétradécène	33,04	0,7	3056	
Hexadécane	36,98	1	4379	

* TR : Temps de rétention (minute)

deux standards externes affichaient des temps de rétention similaires. Neuf (9) des treize (13) composés volatils identifiés par GC-FID ont été également identifiés par GC-MS.

2.0 ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE L'EFFET DES COMPOSÉS VOLATILS DU PEBD

2.1 Effet sur la survie à l'irradiation

Les effets des composés volatils sur la survie à l'irradiation de *Pseudomonas fragi*, *Candida albicans* et *Aspergillus flavus* ont été rapportés au tableau 10. Les expériences avec *A. flavus* et *C. albicans*, avec les sachets PEBD (modèle 1) de 1 an (section A.1, tableau 10) n'ont démontré aucune différence significative de leur taux de survie lorsqu'ils étaient irradiés en présence de plastique ou non. Par contre, les comptes microbiens de *P. fragi* après irradiation, dans les mêmes sachets de PEBD, sont significativement plus faibles qu'en absence de sachet (+I+P = 3,9 et +I-P = 4,3). L'analyse de variance a démontré que cette différence était significative au seuil de $\alpha = 0,05$. Les résultats, avec les cylindres d'acier inoxydable (modèle 2), démontrent un taux de survie plus faible de *P. fragi* (+I+P = 3,9 et +I-P = 4,2), similaire au modèle 1 et demeurant toujours significatif au seuil de $\alpha = 0,05$ (section A.2, tableau 10). Quelque soit le modèle d'étude, aucune différence n'a été notée entre les traitements sans irradiation avec ou sans PEBD. Puisque l'effet des deux modèles d'étude était le même chez *P. fragi* et qu'aucune

variation significative n'était observée chez *A. flavus* et *C. albicans* avec les sachets de PEBD, aucun essai n'a été effectué avec les cylindres d'acier inoxydables pour ces deux derniers microorganismes.

Contrairement au PEBD de 1 an, le plastique de 10 ans a été testé sur les microorganismes dans les cylindres d'acier inoxydable (modèle 2) seulement. Ce modèle offrait des conditions de perméabilité idéales, c'est-à-dire identiques pour chaque traitement, ce qui n'était pas le cas avec les sachets de plastique (modèle 1). Encore une fois, *A. flavus* et *C. albicans* n'ont pas démontré de différence significative lorsque ces microorganismes étaient irradiés en présence ou non de PEBD de 10 ans (section A.3, tableau 10). Chez *P. fragi* l'effet observé était inverse à celui noté en présence du polyéthylène de 1 an (+I+P = 4,1 et +I-P = 3,8). Cette augmentation du nombre d'UFC/ml était significative au seuil de $\alpha = 0,05$. Comme il a été observé précédemment avec le PEBD de 1 an, aucune différence du nombre de colonies n'a été perçue entre les microorganismes n'ayant pas subi d'irradiation qu'il y ait présence ou non de plastique.

2.2 Effet sur l'activité biochimique

Les tests biochimiques complétés sur *P. fragi* et *C. albicans* pour les quatre traitements, en présence de PEBD de 1 an.

Tableau 10 : Survie à l'irradiation de *Pseudomonas fragi*, *Candida albicans* et *Aspergillus flavus* en présence ou absence de PEBD.

A. Polyéthylène de basse densité de type SL3 (Dupont) - 1 an

A.1. Ionisation en sachet (ratio plastique/volume d'air : 2 cm²/ml).

Microorganisme	Dose (kGy)	Comptes microbiens (log UFC/ml)				No. de répétitions
		+I+P	+I-P	-I+P	-I-P	
Pseudomonas fragi	0,25	3,9 ± 0,2 *	4,3 ± 0,1 *	7,9 ± 0,4	7,8 ± 0,5	7
Aspergillus flavus	0,5	3,9 ± 0,1	3,8 ± 0,1	4,9 ± 0,4	4,9 ± 0,1	5
Candida albicans	2,0	4,4 ± 0,2	4,1 ± 0,3	7,0 ± 0,2	7,0 ± 0,1	5

* : différence significative entre les traitements au seuil de $\alpha = 0,05$.

A.2. Ionisation en cylindre d'acier inoxydable (ratio plastique/volume d'air : 20 cm²/ml).

Microorganisme	Dose (kGy)	Comptes microbiens (log UFC/ml)				No. de répétitions
		+I+P	+I-P	-I+P	-I-P	
Pseudomonas fragi	0,25	3,9 ± 0,2 *	4,2 ± 0,3 *	7,7 ± 0,3	7,8 ± 0,2	5

* : différence significative entre les traitements au seuil de $\alpha = 0,05$.

B. Polyéthylène de basse densité de type SL3 (Dupont) - 10 ans

Ionisation en cylindre d'acier inoxydable (ratio plastique/volume d'air : 20 cm²/ml).

Microorganisme	Dose (kGy)	Comptes microbiens (log UFC/ml)				No. de répétitions
		+I+P	+I-P	-I+P	-I-P	
Pseudomonas fragi	0,25	4,1 ± 0,4 *	3,8 ± 0,3 *	7,8 ± 0,5	7,9 ± 0,5	5
Aspergillus flavus	0,5	4,3 ± 0,2	4,3 ± 0,2	5,1 ± 0,2	5,1 ± 0,2	5
Candida albicans	2,0	4,3 ± 0,2	4,4 ± 0,2	7,1 ± 0,1	7,1 ± 0,1	5

* : différence significative entre les traitements au seuil de $\alpha = 0,05$. I : Irradiation P : Plastique

Les résultats de ces tests apparaissent au tableau 11. Quelques mutants ont été retrouvés sur les 2 411 colonies de *Pseudomomas fragi* criblées sur les milieux à base de citrate (10 mutants), de lait de litmus (3 mutants), de Tween 80 (1 mutant) et sur les milieux de fermentation des sucres (1 mutant). Aucune différence évidente du nombre de mutants n'a été relevée entre les quatre traitements.

Sur les 1 000 colonies de *C. albicans* criblées, aucun mutant n'a été décelé sur les milieux de fermentation des sucres mais six colonies ayant été irradiées (avec ou sans PEBD) passaient de la couleur crème à turquoise sur ces milieux. Finalement, chez *A. flavus* aucune modification importante des caractères physiques n'a été observée.

2.3 Toxicité des milieux de culture irradiés

La littérature mentionne que l'irradiation des milieux de culture peut affecter leur composition par la disparition de nutriments et de leur transformation en d'autres produits de radiolyse. Les effets de ces nouveaux produits de radiolyse sur les microorganismes étant inconnus dans le milieu à base de cervelle et de coeur de boeuf (BHI), l'analyse de la croissance microbienne sur ce milieu irradié et non-irradié a été effectuée. Le tableau 12 présente les résultats obtenus.

Tableau 11 : **Mutations sur tests biochimiques de *Pseudomonas fragi* et *Candida albicans* irradiés et exposés aux composés volatils générés par le PEBD.**

***Pseudomonas fragi* ***

Description du test	+I+P	+I-P	-I+P	-I-P
Utilisation du citrate / source de carbon	3	3	3	1
Réactions métaboliques sur le lait de litmus	1	2	0	1
Tolérance au vert brilliant	0	0	0	1
Hydrolyse du Tween 80	0	1	0	0
Fermentation du glucose	0	1	0	0
Fermentation du galactose	0	1	0	0
Fermentation du maltose	0	1	0	0
Fermentation du mannose	0	1	0	0
No. de mutants / tot. de colonies testées (1).	4 / 667	4 / 780	3 / 470	1 / 494

Candida albicans* *

Description du test	+I+P	+I-P	-I+P	-I-P
Fermentation du glucose, galactose, maltose, mannose, tréhalose, saccharose, fructose, lactose.	0	0	0	0
No. de mutants / tot. de colonies testées (1).	0 / 1144	0 / 1179	0 / 1056	0 / 1072

* : Dose d'irradiation : 0,25 kGy
** : Dose d'irradiation : 2,0 kGy

1 : Une même colonie peut être mutante pour plusieurs tests.
I : Irradié
P : Plastique

Tableau 12 : **Effet de l'irradiation du milieu de culture (BHI) sur la croissance de *Pseudomonas fragi*, *Aspergillus flavus* et *Candida albicans*.**

Microorganisme	Dose (kGy)	Comptes microbiens (log UFC/ml)		No. de répétitions
		Milieu irradié	Milieu non-irradié	
Pseudomonas fragi	0,25	9,1 ± 0,1	9,2 ± 0,1	2
Aspergillus flavus	0,5	4,1 ± 0,2	4,2 ± 0,2	3
Candida albicans	1,0	8,2 ± 0,1	8,2 ± 0,1	3

DISCUSSION

1.0 IDENTIFICATION DES COMPOSÉS VOLATILS DU PEBD

1.1 Relation avec la dose d'irradiation

Les deux types de chromatographie ont permis de vérifier clairement la relation entre la production de composés organiques volatils du PEBD et la dose d'irradiation (figure 13, 14 et 16), ce qui a également été observé dans la littérature (Buchalla et al., 1993).

L'augmentation de la concentration de plusieurs composés volatils et d'espèces chimiques oxydées (aldéhydes, cétones, alcools) en fonction de la dose d'irradiation peut être observée au tableau 6. Les différences constatées entre les doses d'irradiation de 0 à 0,25 kGy sont faibles et très importantes de 0 à 5 kGy avec le PEBD de 1 an. Ce n'est pas le cas pour le PEBD de 10 ans dont les résultats seront discutés à la section 1.2. L'élévation de la dose d'irradiation, c'est-à-dire l'augmentation de l'impact de photons et du temps de réaction de l'oxygène, influence directement le nombre d'espèces chimiques générées par le polymère irradié. Le ratio alcanes/aldéhydes, plus faible à 0,25 et 5 kGy qu'à 0 kGy, démontre bien l'action de l'oxygène (figure 15). Le traitement des échantillons de plastique par irradiation a généré des concentrations moins élevées d'undécane, de dodécane, de décane, d'octane et de nonane et des quantités supérieures de nonanal, d'octanal, d'heptanal, de décanal et d'hexanal (composés énumérés en ordre décroissant selon leur concentra-

tion relative). À 5 kGy, l'undécane disparaît complètement suite à sa fragmentation causée par la scission de liens C-C. Sur la figure 15, on peut également constater que la présence de composés insaturés (alcènes) diminue en fonction de la dose d'irradiation puisque les liens doubles (Pi) sont beaucoup moins stables que les liens simples (Sigma) à l'action des électrons de l'oxygène, des électrons propulsés par les photons et des photons eux-mêmes (Vollhardt, 1987). C'est le cas du 1-dodécène qui disparaît complètement à 5 kGy. On peut aussi constater qu'il y a une formation de 4-nonène à 5 kGy contrairement à 0 kGy et 0,25 kGy. Cette observation pourrait aussi être reliée à la fragmentation des chaînes de polyéthylène (Chapiro, 1969). Finalement, l'augmentation de la concentration des dérivés benzéniques en fonction de la dose d'irradiation est remarquable chez le PEBD de 1 an. Elle est principalement causée par l'apparition du 1,3-di(*tert*-butyl)-benzène mais aussi du 1,3-diméthyl-benzène. Le 1,3-di(*tert*-butyl)-benzène a également été identifié par El Makhzoumi (1991) et correspond à un produit résultant de l'oxydation d'un additif antioxydant.

La présence d'acides carboxyliques n'a pas été observée lors de nos expériences contrairement à ce qui a été indiqué par Azuma et al. (1984). Les doses d'irradiation plus faibles utilisées lors de nos travaux seraient en partie responsables de l'absence de ces acides, ce qui a été confirmé par les résultats de Rojas de Gante et Pascat (1990). Ils ont mesuré

de faibles productions d'acides carboxyliques aux doses inférieures à 10 kGy. Le temps d'oxydation, à faible dose, était probablement trop court pour une formation importante de fonctions acides, des fonctions qui requièrent une double oxydation. La faible concentration d'acides générés n'était donc pas en mesure d'atteindre la sensibilité de l'appareil. Le deuxième élément pouvant être responsable de cette absence d'acide carboxylique était l'utilisation de colonnes capillaires de type non-polaires (DB-5) pour la chromatographie. Elles ne permettaient pas une très bonne séparation de ces composés polaires rendant leur identification par le logiciel HPChem impossible.

1.2 Relation avec l'âge du polyéthylène

Le PEBD de 10 ans ne produisait pas le même profil de composés volatils que celui de 1 an. Par exemple, l'analyse du PEBD de 10 ans a démontré la présence d'un nombre plus élevé de cétones à 0 kGy (2-décanone et 6-méthyl-5-heptène-2-one), à 0,25 kGy (2-nonanone) et à 5 kGy (3-heptanone, 3-octanone et 5-nonanone, 2-octanone). Aucune concentration d'alcène n'était générée à 0 kGy et très peu à 0,25 kGy (1-dodécène) alors que le PEBD de 1 an produisait des concentrations supérieures (tableau 7). De plus, à 0,25 kGy et 5 kGy, on note la formation d'alcools en C7 et C8, absents chez le PEBD de 1 an. Ces observations sont liées au vieillissement du polymère d'emballage. Elles sont occasionnées par une oxydation issue de

l'action combinée du rayonnement U.V. et de l'oxygène (réactions photochimiques) entraînant la disparition de composés insaturés et la formation de composés oxydés (Searly, 1986). Le PEBD de 10 ans, comme celui de 1 an, génère à 5 kGy le 4-nonène mais aussi le 1-décène et le 4-décène, résultant probablement d'une dégradation plus poussée des chaînes de polyéthylène. À 0 et 0,25 kGy, les concentrations d'aldéhydes et d'alcanes étaient légèrement plus faibles que celles produites par le PEBD de 1 an. De plus, le profil des alcanes n'était pas exactement le même, la concentration d'octane chez le PEBD de 10 ans était plus grande que celle des 4 autres alcanes majeurs. La prédominance de cet alcane de faible poids moléculaire s'explique par l'action de l'oxygène, lors du vieillissement, qui fragmente les chaînes de carbones plus longues. Le profil des aldéhydes était similaire au PEBD de 1 an sauf que le PEBD de 10 ans produisait du benzaldéhyde à 0,25 kGy. Finalement, très peu de dérivés benzéniques ont été produits par le PEBD de 10 ans. De faibles quantités de 1-éthyl-benzène, 1,3-dimethyl-benzène et de 1,2-dichloro-benzène ont été retrouvés, sans aucune trace de 1,3-di(*tert*-butyl)-benzène. Il faut conclure que les antioxydants ont été presque totalement détruit avec le temps. Le polymère ayant perdu sa protection à l'oxydation, les pertes de composés par volatilisation ont été amplifiées avec les années. Ce phénomène est bien illustré à la figure 15 pour le PEBD de 10 ans irradié à 5 kGy.

2.0 EFFET MICROBIOLOGIQUE DES COMPOSÉS VOLATILS DU PEBD

2.1 Effet sur la radiorésistance microbienne

Afin de mesurer l'effet général des composés volatils générés par le PEBD sur le monde microbien, les microorganismes appartenant à trois groupes différents ont été sélectionnés: une bactérie du monde procaryote (*Pseudomonas fragi*), une levure (*Candida albicans*) et une moisissure (*Aspergillus flavus*) du monde eucaryote. Plus la radiorésistance de ces microorganismes était élevée, plus la concentration en composés volatils générés en leur présence était grande.

2.1.1 Influence de la radiorésistance intrinsèque

Il s'est avéré que *P. fragi* était le seul microorganisme sensible à la combinaison des composés volatils et de l'irradiation et qu'il était aussi faiblement radiorésistant. Cette faible résistance (section A.1, tableau 10) face aux composés volatils peut être interprétée, selon Boreham et Mitchell (1991), par une moins bonne efficacité du système de réparation de l'ADN endommagé par la radiation ionisante. Les auteurs soulignent que ce système est aussi lié à la réparation de certaines lésions causées au matériel génétique microbien par des substances chimiques.

Les composés volatils générés par le PEBD de 10 ans n'agissaient pas de façon néfaste sur *P. fragi*. On peut constater à la section A.2 du tableau 10, que ces substances protégeaient

P. fragi contre l'irradiation puisque son taux de survie était meilleur en présence du plastique. La discussion sur la composition des substances volatiles générées par les deux polymères à la section suivante, tente d'expliquer ce double comportement.

2.1.2 Influence de la composition du mélange volatil

L'étude du profil des composés volatils générés par le PEBD de 1 an et de 10 ans, après consultation de la littérature, permet d'approfondir la discussion sur la nature de l'action inhibitrice et protectrice provoquée par le polyéthylène d'emballage. Étant donné que l'irradiation des milieux de culture n'affectait pas la croissance des microorganismes (tableau 12), l'action des composés volatils semble être la principale cause des effets observés sur la survie des microorganismes irradiés.

2.1.2.1 Aldéhydes

Une quantité relativement importante d'aldéhydes est générée par le PEBD irradié à 0,25 kGy (figure 15). Les aldéhydes sont reconnus comme des substances ayant un haut potentiel antimicrobien (Maruzzella et al. 1961 et Gueldner et al., 1985). D'ailleurs, les effets inhibiteurs de l'hexanal (2,1 mg/l d'air) et le (E)-2-hexenal (0,04 mg/l d'air) sont très forts sur la souche *Pseudomonas syringae* (tableau 5). On serait donc porté à croire que l'action inhibitrice des composés volatils du PEBD de 1 an observée sur *P. fragi* pourrait provenir des

aldéhydes. L'effet contraire a pourtant été observé sur *P.fragi* en présence du PEBD de 10 ans générant une quantité d'aldéhydes équivalente. De plus, le profil des aldéhydes produits par les deux PEBDs est sensiblement le même (tableaux 6 et 7). Cependant, du benzaldéhyde était produit en faible concentration par le PEBD de 10 ans à 0,25 kGy. Il possède un fort potentiel de réaction avec les radicaux libres et pourrait protéger *P. fragi* de ces substances toxiques.

Curieusement, la littérature indique qu'à faible concentration (0,003-4 mg/l d'air), certains aldéhydes (C6 à C11) stimulent la croissance de certaines moisissures (Nyman, 1969 et Hamilton-Kemp et al., 1992,) mais, est-ce le cas pour les bactéries? L'action précise des aldéhydes sur *P.fragi* ne peut être affirmée à cette étape mais il est permis de croire que l'effet inhibiteur (PEBD de 1 an) ou protecteur (PEBD de 10 ans) ne provient pas uniquement des aldéhydes mais aussi de composés décrits dans les sections suivantes.

2.1.2.2 Cétones

En observant le même tableau, on peut constater que le PEBD de 1 an produit moins de cétones que son vis-à-vis de 10 ans. Cependant, les méthylcétones (2-nonanone, 2-décanone et 2-undécanone) générés par le PEBD de 10 ans (tableau 7) possèdent un potentiel inhibiteur faible et souvent inexistant chez les bactéries (Vaughn et al., 1993 et Gueldner et al., 1985).

Étant très faiblement concentrées chez le PEBD de 1 an, il est possible que les cétones ne soient pas responsables de l'inhibition de *P. fragi*.

2.1.2.3 Alcanes et alcènes

Les n-alcanes de faible poids moléculaire ont été retrouvés en concentration supérieure aux cétones pour les deux polymères. Le PEBD de 1 an présentait une concentration légèrement supérieure d'undécane et de dodécane (tableau 6). Le genre *Pseudomonas* fait partie d'un groupe restreint de microorganismes possédant une aptitude à dégrader les n-alcanes (Walker et Colwell, 1976). Selon cette caractéristique, il serait possible que l'action de protection ou de stimulation de *P. fragi* observée chez le PEBD de 10 ans provienne des alcanes, ceux-ci servant de source de carbone. Toutefois, les concentrations générées semblent loin des grandes quantités nécessaires pour le co-métabolisme. De plus, le PEBD de 1 an générait une quantité plus élevée d'alcanes sans provoquer de tels effets.

Les alcanes pourraient toutefois agir comme inhibiteurs de croissance (Stirling, 1980) mais leur toxicité exacte à l'état volatil n'a pas été retrouvée dans la littérature. La quantité d'alcanes générés par le PEBD de 1 an étant relativement faible, il est probable que le potentiel inhibiteur de ces composés n'existe qu'en association avec une ou plusieurs autres substances du mélange gazeux. Cette hypothèse, s'appli-

querait également aux alcènes puisqu'ils sont aussi faiblement concentrés.

2.1.2.4 Dérivés benzéniques

La présence d'un benzène substitué de deux groupements alkyles constitue la différence majeure entre les composés volatils générés par les deux PEBDs (tableaux 6 et 7). Le 1,3-di(*tert*-butyl)-benzène, libéré par le PEBD de 1 an, possède la concentration la plus élevée après les aldéhydes. Il semble évident que ce produit soit impliqué dans l'action inhibitrice du mélange volatil sur *P.fragi*. Peu de références, toutefois, traitent de l'action inhibitrice du benzène et de ses dérivés sur les microorganismes. Dans certains articles sur la biorémédiation, on reconnaît la toxicité importante de ce type de composés sur la flore microbienne marine (Alvarez et Vogel, 1991). On constate aussi, d'après les résultats de ces deux chercheurs, que le xylène, contrairement au benzène, n'est pas dégradé par la souche *Pseudomonas* sp. CFS-215. La présence de ramifications alkyles semble accroître la toxicité de ce genre de composé volatil. D'ailleurs, le coefficient de partage octanol/eau est encore plus élevé lors de la présence de substituants alkyles (Leo et al., 1971). Plus hydrophobe, ce produit s'adsorbe mieux aux cellules bactériennes que dans le milieu de culture et est donc susceptible de causer un effet inhibiteur. L'action inhibitrice directe du 1,3-di(*tert*-

butyl)-benzène sur *P. fragi* constitue donc une hypothèse valable lorsqu'appuyée de ces informations.

Certains groupes de microorganismes environnementaux, dont *Pseudomonas*, possèdent cependant l'aptitude à hydroxyler (formation de catéchol) et ouvrir le cycle aromatique de ces hydrocarbures à l'aide des enzymes monooxygénase et dioxygénase (Brock et Madigan, 1988). Dans le cas où 1,3-di(*tert*-butyl)-benzène serait hydroxylé par *P. fragi*, il est possible que l'action inhibitrice, observée lors de la présence de ce composé, provienne de composés intermédiaires de dégradation, comme par exemple l'acide muconique (cis,cis-muconate). Cet acide dicarboxylique pourrait réduire la survie de *P. fragi* à l'irradiation par l'abaissement du pH interne de la cellule. Cette deuxième hypothèse est moins certaine mais plausible.

Les dérivés benzéniques (1-éthyl-benzène, 1,3-dimethyl-benzène et de 1,2-dichloro-benzène) générés en faible quantité par le PEBD de 10 ans pourraient toutefois être à l'origine de la protection de *P. fragi*. Les composés à base de benzène sont reconnus pour piéger les radicaux libres. En présence de ces composés fortement électrophiles, le benzène partage ses électrons pour se lier à ces molécules et ainsi les stabiliser (Vollhardt, 1987). Le potentiel inhibiteur des radicaux libres est alors réduit.

2.1.2.5 Alcools

Une observation intéressante a été effectuée chez le PEBD de 10 ans, la génération de deux n-alcools soit: le 1-heptanol et le 1-octanol (tableau 7). Il a été démontré que la présence d'alcools (éthanol, *tert*-butanol) peut protéger les microorganismes contre l'irradiation (Worm et al., 1993). Cette caractéristique des alcools pourrait être partiellement responsable du nombre plus élevé de microorganismes en présence des composés volatils générés par le PEBD de 10 ans irradié.

2.1.2.6 Effets d'addition, de potentialisation et de synergie

L'interprétation de l'action antimicrobienne d'un mélange de composés chimiques sur des microorganismes est difficile puisqu'il s'agit de toxicité de mélange (Klassen et Eaton, 1991). L'association de deux ou plusieurs composés peut conduire, premièrement, à un effet d'addition ou de synergie qui augmente la toxicité du mélange par rapport à celle des substances isolées. Il peut se produire un effet de potentialisation où l'action d'un composé est mis en valeur par un deuxième, ce dernier ne possédant aucun effet toxique.

Un de ces trois phénomènes pourrait être impliqué quant à l'effet inhibiteur observé chez le PEBD de 1 an sur *P. fragi*. Les composés les plus susceptibles d'agir en association sont le 1,3-di(*tert*-butyl)-benzène avec un ou plusieurs aldéhydes

puisque, lorsqu'il y a absence de ce benzène substitué (PEBD de 10 ans), un effet inverse est observé.

L'effet protecteur observé chez le PEBD de 10 ans pourrait provenir de la combinaison des alcools (le 1-heptanol et le 1-octanol) et des dérivés benzèniques faiblement concentrés (alkyl-benzènes et benzaldéhyde). L'action conjointe de ces composés pourrait mettre un frein à l'action néfaste des radicaux libres sur les microorganismes.

2.1.2.7 Effet antagoniste

La combinaison de plusieurs composés peut également mener à un effet antagoniste qui réduit l'efficacité initiale de chaque composé (Klassen et Eaton, 1991). Dans le cas du PEBD de 10 ans, le potentiel inhibiteur des aldéhydes pourrait être affaibli en réagissant avec d'autres composés qui étaient absents chez le PEBD de 1 an. Par exemple, les alcools produits par le plastique de 10 ans peuvent théoriquement réagir avec les aldéhydes et former des acétals (Vollhardt, 1987). Bien qu'ici la concentration des alcools ne soit pas idéale pour ce type de réaction, ce genre de situation pourrait être à l'origine d'une réduction de la toxicité des aldéhydes. Cet exemple démontre que les hypothèses avancées précédemment peuvent être erronées si des réactions chimiques se produisent entre les composés volatils.

2.1.3 Influence de la concentration des composés volatils

Il semble que l'effet de la composition des mélanges volatils, chez les microorganismes testés, soit supérieur à celui de leur concentration produite par un ratio plastique/volume d'air (P/V) 10 fois plus grand.

Les essais complétés avec le deuxième modèle d'étude (cylindres d'acier inoxydable, section 2.2.1) et le PEBD de 1 an, n'ont pas démontré d'impact suite à l'accroissement de la quantité de plastique. Si le ratio P/V du modèle 2 produisait plus de composés volatils qu'en sachet, leur concentration n'a pas été suffisante pour augmenter ou changer l'effet sur les microorganismes. La superposition des feuilles de PEBD dans les cylindres d'acier inoxydable a probablement occasionné une moins grande libération de composés volatils que prévue.

2.1.4 Influence liée à la production de gaz dans l'atmosphère interne de l'emballage

Du CO_2 et de l'H_2 gazeux sont générés lors de l'irradiation du PEBD (tableau 3). Malgré leur concentration inférieure aux composés volatils de faible poids moléculaire, ces deux gaz pourraient modifier la composition atmosphérique à l'intérieur des boîtes de Petri emballés, contrairement aux boîtes sans emballage.

Le CO_2 présente des effets toxiques pour les microorganismes à partir d'environ 5% dans l'air (Lambert, 1991). La concen-

tration de CO_2 dans nos montages est estimée à moins de 0,1 mg/l selon les données de Killoran (1972) (1µg de CO2 / g de PEBD irradié à 10 kGy) ce qui n'est pas suffisant pour atteindre une concentration létale.

L'hydrogène, n'ayant pas d'effet microbicide, pourrait en grande concentration réduire la présence d'oxygène nécessaire aux microorganismes. Lanciotti et Guerzoni (1993) ont vérifié que pour retarder la phase de latence d'une moisissure, il fallait abaisser la concentration d'oxygène entre 0,15 à 0,3%. L'hydrogène, estimé à une concentration maximale de 1 mg/l dans nos montages d'après les résultats de Killoran (1972), n'est donc pas susceptible de causer un tel effet.

2.2 Effet sur l'activité enzymatique et les caractères physiques des microorganismes

Les tests biochimiques complétés sur *P. fragi* et *C. albicans* ne nous ont pas permis d'établir une corrélation entre les composés volatils produits par le PEBD de 1 an et leur activité enzymatique.

Les taux de mutations décelés chez *P. fragi* pour chaque traitement sont très faibles (< 1%) et similaires entre-eux (tableau 10). La présence des composés volatils, qu'on aurait pu imaginer être la cause de la production de mutants, ne semble pas avoir d'effet évident sur l'activité enzymatique de ce microorganisme. Un nombre curieusement plus élevé de *P. fragi* mutants (10 mutants) a été observé sur le milieu à base

de citrate. Il est difficile d'affirmer si ce comportement sur ce milieu était lié à des mutations naturelles ou à l'action des traitements appliqués sur cette bactérie. Les autres tests biochimiques n'affichaient pas de fréquences de mutation de cet ordre.

Aucune mutation n'a été observée lors de la fermentation des sucres par *C. albicans*. La grande radiorésistance de ce microorganisme est probablement liée à cette stabilité du mécanisme enzymatique d'utilisation des sucres. La formation de six colonies turquoise, provenant des traitements avec irradiation, a cependant été constatée sur ces milieux. Ces levures auraient probablement perdu à prime abord une résistance à la fixation du colorant bleu pourpre.

La présence d'un seul thalle d'*Aspergillus flavus* d'apparence différente sur la totalité des thalles observés lors de l'expérimentation démontre que le traitement d'irradiation, combiné à l'action des composés volatils, n'influence pas l'apparence physique de cette moisissure.

CONCLUSION

L'identification de composés volatils, générés par le PEBD à faible dose d'irradiation (0,25 kGy), a permis de discuter de l'effet observé sur le taux de survie de *Pseudomonas fragi* en présence de ce polymère lors d'un traitement d'irradiation. La résistance aux composés volatils par les espèces eucaryotes, *Aspergillus flavus* et *Candida albicans*, à 0,5 et 2 kGy, laisse sous-entendre que la radiorésistance intrinsèque microbienne est intimement liée à ce phénomène.

La variation du spectre des composés volatils, générés par deux PEBD de dates de fabrication différentes (1 an et 10 ans), semble influencer de façon inverse le taux de survie à l'irradiation de *P. fragi*. La présence éminente du 1,3-di(*tert*-butyl)-benzène chez le PEBD de 1 an semble inhiber *P. fragi* alors que la production par le PEBD de 10 ans du 1-heptanol, du 1-octanol, du benzaldéhyde et des autres dérivés benzéniques alkylés expliquerait la radioprotection de ce microorganisme. Une augmentation par dix de la quantité de PEBD de fabrication récente (1 an), n'occasionna pas de modification des tendances observées avec un ratio plus faible.

Pour mieux connaître le potentiel d'action des substances retrouvées dans le mélange volatil provenant du PEBD irradié, il serait intéressant de valider nos hypothèses en travaillant spécifiquement sur les composés identifiés lors de ce projet. Une quantification par chromatographie de ces composés volatils serait un travail de longue haleine, mais très utile pour

accomplir cette tâche. Finalement, la vérification de l'action de ces composés volatils sur d'autres bactéries et avec d'autres polymères d'emballage serait une excellente façon de déterminer l'étendue de ce phénomène.

Le concept d'une étude du genre pourrait mener au développement de systèmes performants de conservation d'aliments emballés et irradiés. Toutefois, il serait souhaitable de s'assurer par d'autres études, que pour chacun des emballages et des aliments pouvant être irradiés, il n'y ait pas de stimulation de la croissance de bactéries suite à ce traitement. Un tel comportement pourrait mettre en cause l'innocuité des aliments irradiés.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier cordialement Raymond Charbonneau et Louise Deschênes pour m'avoir permis d'accomplir cette enrichissante expérience dans le monde de la recherche. Leur support et leur confiance à mon égard ont été très appréciés.

Ma reconnaissance va également au personnel de l'Institut Armand-Frappier et du Centre de recherche et développement sur les aliments de St-Hyacinthe ayant contribué de près ou de loin au bon déroulement de mon projet de maîtrise. J'aimerais remercier particulièrement Guy McSween pour ses judicieux conseils techniques et Chantal Thibault pour son assistance lors de réflexions profondes sur les résultats de la recherche. Je voudrais souligner aussi l'excellent travail en statistiques de Nathalie Rodrigue.

Je remercie le Dr. Mafu Akier Assanta pour m'avoir fourni un emplacement de travail au Laboratoire d'Hygiène Vétérinaire et Alimentaire de St-Hyacinthe et le personnel des services communs pour leur professionnalisme.

J'adresse à ma famille et à ma compagne, Marilyne Hamelin, une grande reconnaissance pour leur appui inconditionnel et leur compréhension à travers les hauts et les bas de ma maîtrise.

La réalisation de ce projet de recherche a été rendue possible grâce au support financier du Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec via le

Conseil de recherches en pêche et en agroalimentaire du Québec et de la collaboration d'Agriculture et Agroalimentaire Canada.

BIBLIOGRAPHIE

AIRABA, K. 1980. Shokuryo Hozo To Biseibutsu. Fujimaki, M. p.63. In Shokuryo Hozogaku. Asakura Shoten, Tokyo.

ALVAREZ, P.J.J. et VOGEL, T.M. 1991. Substrate interactions of benzene, toluene and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. Appl. Env. Microbiol., **57**(10): 2981-85.

ANDERSON, J.G. et SMITH, J.E. 1972. The effect of elevated temperatures on spore swelling and germination in *Aspergillus niger*. Can. J. Microbiol., **18**: 289-297.

ANELLIS, A., BERKOWITZ, D. et KEMPER, D. 1973. Comparative resistance of nonsporogenic bacteria to low-temperature gamma irradiation. Appl. Microbiol. **25**(4): 517-523.

ARINO, A.A. et BULLERMAN, L.B. 1993. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 as affected by the fungicide ioprodione. J. Food Protec., **56**(8): 718-721.

ATLAS, R.M. 1993. Handbook of Microbiological Media. Parks, L.C. CRC Press, Inc., N.Y. 1079 pp.

ATSUO, T. et SABURO, F. 1989. Metabolism of n-alkanes. Chap.7. In The Yeasts: Metabolism ans Physiology of Yeasts. 2 éd. Rose, A.H. et Harrison, J.S. Academic Press Inc., N.Y. vol.3. 635 pp.

AZUMA, K., HIRATA, T., TSUNODA, H., ISHATANI, T. et TANOKA, Y. 1983. Identification of the volatiles from low density polyethylene film irradiated with an electron beam. Agr. Biol. Chem., **47**(4): 855-860.

AZUMA, K., HIRATA, T., TSUNODA, H., ISHATANI, T. et TANOKA, Y. 1984. Effects of film variety on the amounts of carboxylic acids from electron beam irradiated polyethylene film. Agr. Biol. Chem., **48**(8): 2003-2008.

AZUMA, K., HIRATA, T., TSUNODA, H., ISHATANI, T. et TANOKA, Y. 1984. Effects of conditions for electron beam irradiation on the amounts of volatiles from irradiated polyethylene films. Agr. Biol. Chem., **48**(8): 2009-2015.

BALLESTEROS, S.A., CHIRIFE, J. et BOZZINI, J.P. 1992. Antibacterial effects and cell morphological changes in *Staphylococcus aureus* subjected to low ethanol concentrations. J. Food Sci., **58**(2): 435-438.

BELLIN, J.M. 1989. Les flores d'altération des aliments/ Les levures. Chap.4. In Microbiologie Alimentaire. Tome 1: Aspect Microbiologique de la Sécurité et de la Qualité Alimentaire. Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. et Zucca, J. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 422 pp.

BERSCH, C.F., STROMBERG, R.R. et ACHHAMMER, B.G. 1959. Effect of radiation on plastic films. Mod. Pack., **32**(8): 117-121, 166, 168.

BILLEN, D. 1984. The role of hydroxyle radical scavengers in preventing DNA strand break induced by X-irradiation in toluene-treated *Escherichia coli*. Radiat. Res., **97**: 626-629.

BOREHAM, D.R. et MITCHELL, E.J. 1991. DNA lesions that signal the induction of radioresistance and DNA repair in yeast. Radiat. Res., **128**: 19-28.

BOTTON, B. 1990. Moisissures Utiles et Nuisibles, Importance industrielle. 2ème édition. Masson, Paris.

BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. et SMITH, N.R. 1957. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7ième édition. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1094 pp.

BROADWATER, W.T., HOEHN, R.C. et KING, P.H. 1973. Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. Appl. Microbiol., **26**: 391.

BROCK, T.D. et MADIGAN, M.T. 1988. Biology of Microorganisms, 5e édit., Prentice Hall, N.J., 835 pp.

BROWN, W.E. 1992. Plastics in Food Packaging. Marcel Dekker Inc. N.Y. 539 pp.

BRUNS, M.A. et MAXCY, R.B. 1979. Effect of irradiation temperature and drying on survival of highly radiation-resistant bacteria in complex menstrua. J. Food Sci., **44**: 1743-1746.

BRYNJOLFSSON, A. et WANG, C.P. 1982. Atomic structures. Chap.4. In Preservation of Food by Ionizing Radiation. Josephson, E.S. et Peterson, M.S., CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, vol. 1, 378 pp.

BUCHALLA, R., SCHÜTTLER, C. et WERNER BOGL, K. 1993. Effects of ionizing on plastic food packaging materials: a review. / Part 1: Chemical and physical changes. J. Food Protec., **56**(11): 991-997.

BUREAU, G. 1989. Traitement ionisant et emballage-conditionnement-préservation des aliments conditionnés en emballage souple. Chap.6. In L'Emballage des Denrées Alimentaires de Grande Consommation. Bureau, G. et Multon, J.-L. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, 730 pp.

CFR (Code of Federal Regulations (U.S.)). 1986. Title 21. Food and Drugs Subpart C, Packaging Materials for Irradiated Foods 179.45, 356.

CHAPIRO, A. 1969. Radiation-induced reactions. In Encyclopedia of Polymer Science and technology, John & Sons, vol.11, NY, 847 pp.

CHARBONNEAU, R., DUBOIS, G., MICUSAN, V. ET GAGNON, M. 1986. Effets des rayons gamma sur la conservation des crevettes nordiques et sur la flore bactérienne. Sci. Alim., **6**: 245-256.

COLWELL, R.R. 1978. Toxic effects of pollutants on microorganisms. Chap. 13. In Principles of Ecotoxicology, Scope 12. Butler, G.C., John Wiley and Sons, NY, 350 pp.

COOPER, S. 1991. Bacterial Growth and Division Biochemistry and Regulation of Procaryotic and Eucaryotic Division Cycles. Academic Press Inc., NY, 501 pp.

CRAMP, W.A. 1969. Radiation protection of *Shigella flexneri* Y6R by ethanol, ß-mercaptoethanol and several polyhydric alcohols. Int. J. Radiat. Biol., **15**: 227-232.

DAVIS, B.D., GINSBERG, H.S., EISEN, H.N et DULBECCO, R. 1980. Microbiology / Including Immumology and Molecular Genetics. Harper and Row Publishers, Hagerstown, Md., 1355 pp.

de LEIRIS, J.P. 1989. Les films plastiques. Chap.18. In L'Emballage des Denrées Alimentaires de Grande Consommation. Bureau, G. et Multon, J.-L. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, 730 pp.

DEWEY, D.L. 1963. The X-ray sensitivity of *Serratia marcescens*. Radiat. Res. **19**: 64-87.

DICKSON, J.S. et MAXCY, R.B. 1984. Effect of radiolytic products on bacteria in a food system. J. of Food Sci., **49**: 577-580.

DIEHL, J.F. 1990. Safety of Irradiated Foods. Marcel Dekker Inc., N.Y. 345 pp.

DIFCO LABORATORIES. 1984. Difco Manual/Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology, 10e éd., Detroit, Michigan, 48232, USA.

DION, P., CHARBONNEAU, R. et THIBAULT, C. 1994. Effect of ionizing dose rate on the radioresistance of some food pathogenic bacteria. Can. J. Microbiol., **40**: 369-374.

DUPUIS, P. et TRÉMEAU, O. 1962. Influence des conditions de culture sur la résistance aux radiations de quelques *Lactobacillus*. Chap. 10. In L'Emploi des Radioisotopes en Sciences Nutritionelles et des Rayonnements Ionisants en Technologie Alimentaire. J. Sc. CNRS XII, 479 pp.

EGYÜD, L.G. 1967. The effect of aldehydes, ketones and α-ketoaldehydes on the proliferation of *E. coli*. Curr. Mod. Biol., **1**: 14-20.

EKLUND, T. 1989. Organics acids and esters. In Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures. Gould, G.W., Elsevier Applied Science, N.Y, 441 pp.

ELIAS, P.S. 1979. Food irradiation and food packaging. Chem. Ind., **10**: 336-341.

EL MAKHZOUMI, Z. 1991. Influence de l'ionisation bêta sur quelques matériaux d'emballage: étude qualitative et quantitative des composés volatils. Sc. D. Thesis, Université de Reims, France.

ENFORS, S.-O. et MOLIN, G. 1981. The effect of different gases on the activity of microorganisms. In Psychrotrophic microorganisms in spoilage and pathogenicity. Roberts, T,A., Hobbs, G., Christian, J.H.B. et Skovgaard, N., Academic Press, NY, 529 pp.

EWING, D. et KUBALA, G.J. 1987. Radiation protection of *Escherichia coli* B/r by hydroxyl radical scavengers. Radiat. Res., **109**: 256-274.

FEAZEL, C.E., BURKS, R.E., MOSES, B.C. et TRIPP, G.E. 1960. Testing packages for irradiated foods. Pack. Eng. **5**(4)43-45, 121, 124.

FENNEMA, O.R. 1985. Lipids. In Food Chemistry. Marcel Dekker Inc., N.Y., 991 pp.

FRANKENBERG-SCHWAGER, M., FRANKENBERG, D., BLOCHER, D. and ADAMCZYK, C. 1980. Repair of DNA double-strand breaks in irradiated yeast cells under nongrowth conditions. Radiat. Res. **82**: 498-510.

FRAZIER, W.C. et WESTHOFF, D.C. 1988. Food and microorganisms. Chap.2. In Food Microbiology. 4e éd. McGraw-Hill Book Co., NY, 539 pp.

FRIES, N. 1973a. Effect of volatile organic compounds on the growth and development of fungi. Trans. Br. Mycol. Soc., **60**: 1-21.

FRITSCH, P. 1989. Risques toxicologiques. Chap.7. In L'Emballage des Denrées Alimentaires de Grande Consommation. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, 730 pp.

GARRAWAY, M.O. et WEINHOLD, A.R. 1968. Influence of ethanol of glucose-^{14}C assimilated by *Armillaria mellea*. Phytophatology, **58**: 1190-1191

GENSTAT 5 COMMITTEE. 1993. Genstat 5 Reference Manual, Clarendon Press, Oxford, 796 pp.

GOCHO, S. 1991. Antibacterial mechanism of aroma chemical vapors. J. Antibact. Antifung. Agents, **19**(10): 511-515.

GRECZ, N., ROWLEY, D.B. et MATSUYAMA, A. 1983. The action of radiation on bacteria and viruses. Chap.4. In Preservation of Food by Ionizing Radiation. Josephson E.S. and Peterson, M.S.. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, vol.2, 343 pp.

GREEN, J.H.et KAYLOR, J.D. 1977. Variations in the microbial log reduction curves of irradiated cod fillets, shrimp and their respective homogenates. Appl. Env. Microbiol., **33**(2): 323-327.

GRIFFIN, D.H. 1981. Spore formation: Environmental Factors. Chap. 9. In Fungal Physiology. John Wiley ans sons, NY, 383 pp.

GUELDNER, R.C., WILSON, D.M. et HEIDT, A.R. 1985. Volatile compounds inhibiting *Aspergillus flavus*. J. Agr. Food and Chem., **33**: 411-413.

HAMELIN, C., SARHAN, F. et CHUNG, Y.S. 1977. Ozone-induced DNA degradation in different DNA polymerase I mutants of Escherichia coli K12. Biochem. Biophys. Res. Commun., **77**: 220-224.

HAMILTON-KEMP, T.R., McCRACKEN, C.T.(Jr), LOUGHRIN, J.H., ANDERSEN, R.A. et HILDEBRAND, D.F. 1992. Effects of some natural volatile compounds on the pathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Botrytis cinerea*. J. Chem. Ecol., **18**(7): 1083-1091.

HAYASHI, T. 1991. Comparative effectiveness of gamma-rays and electron beams in food irradiation. Chap. 7. In Food Irradiation. Thorne, S., Elsevier Applied Food Science Series, NY, 332 pp.

HEGAZY, E.A., SEGUCHI, T., ARAKAWA, K. et MACHI, S. 1981. Radiation-induced oxidative degradation of isotactic propylene. J. Appl. Polym. Sci. **26**: 1361-1372.

HOBBS, G., FRAZER, C.M., GARDNER, D.C.J., CULLUM, J.A. et OLIVER, S.G. 1989. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. Appl. Microbiol. Biotechnol., **31**: 272-277.

HORNG, P. et KLEMCHUK, P. 1984. Stabilizers in gamma-irradiated polypropylene. Plast. Eng. **4**: 35-37

IAEA. 1982. Training Manual on Food Irradiation Technology and Techniques. 2e edition, Vienne, 205 pp.

INGRAM, L.O. 1981. Mechanism of lysis of *Escherichia coli* by ethanol and other chaotropic agents. J. Bacteriol. **146**: 331-336.

JENKINS, W.A. et HARRINGTON, J.P. 1991. Packaging Foods with Plastics. Technomic Publishing Co., Pensylvania, 326 pp.

KAY, F.L et KINSELLA, J.E. 1975. Physicochemical aspects of food flavouring. Chem. Ind., **12**: 505-509.

KEAY, J.N. 1968. The effect of doses of gamma radiation up to 16 Mrad on plastic packaging materials for fish. J. Food Technol., **3**: 123-129.

KHARE, S., JAYAKUMAR, K., TRIVEDI, A., KESAVAN, P.C. et PRASAD, R. 1982. Radiation effects on membranes, I. Cellular permeability and cell survival. Radiat. Res., **90**: 233-243.

KILLORAN, J.J. 1972. Chemical and physical changes in food packaging materials exposed to ionizing radiation. Radiat. Res. Rev., **3**: 369-388.

KING, A.D. (Jr) et NAGEL, C.W. 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Food Sci., **40**: 362-366.

KLASSEN, C.D. et EATON, D.L. 1991. Principles of Toxicology. Chap 2. In Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Amdur, M.O., Doull, J. et Klassen, C.D., 4 éd., Pergamon Press.

KOUDELA, K., RYZNAR, L., KOZUBEK, S. et SLOTOVA, J. 1992. Induction of SOS repair by ionizing radiation / Results from experiments at accelerators. Radiat. Env. Biophys., **31**(4) 343-8.

KUBO, I., MUROI, H. et HIMEJIMA, M. 1993. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* of mate tea flavor components. J. Agric. Food Chem., **41**: 107-111.

LABADIE, J.C. et DOUSSET, X. 1989. Les flores d'altération des aliments/ Les *Pseudomonas*. Chap.4. In Microbiologie Alimentaire. Tome 1: Aspect Microbiologique de la Sécurité et de la Qualité Alimentaire. Bourgeois, C.M., Mescle, J.F. et Zucca, J. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 422 pp.

LABUZA, T.P. and BREEN, W.M. 1989. Application of active packaging for improvement of shelf-life and nutritional quality of fresh and extended shelf-life foods. J. Food Proc. Preserv., **13**(1), 1-69.

LAMBERT, A. 1991. Shelf life and microbiological safety of MAP irradiated fresh pork. Ph. D. Thesis, Departement of Food Science, MacDonald College, McGill University, Montréal (Québec).

LAMBERT, A.D., SMITH, J.P., DODDS, K.L. et CHARBONNEAU, R. 1992. Microbiological changes and shelf life of MAP, irradiated fresh pork. Food Microbiol., **9**: 231-244

LAMBERT, J. et MAXCY, R.B. 1984. Effect of gamma radiation on *Campylobacter jejuni*. J. Food Sci., **49**(3): 665-667.

LANCIOTTI, R. and GUERZONI, M.E. 1993. Competitive inhibition of *Aspergillus flavus* by volatile metabolites of *Rhizopus arrhizus*. Food Microbiol. **10**: 367-377.

LeCLAIR, H.G. et COBBS, W.H. 1958. Effects of radiation on plastic packaging films. Ind. Eng. Chem., **50**(3): 323-326.

LEFEBVRE, N., THIBAULT, C. et CHARBONNEAU, R. 1992. Improvement of shelf-life and wholesomeness of ground beef by irradiation, I. Microbial Aspects. Meat Sci., **32**: 203-213

LEO, A., HANSCH, C. et ELKINS, D. 1971. Partition coefficient and their uses. Chem. Rev., **71**(6): 525-615.

LOX, F., De SMET, R., WALDEN, A. et MACHIELS, J. 1986. Proceedings 5th International IAPRI Conference, Bristol, October 7-9.

LYR, H. et BANASIAK, L.A. 1983. Alkenals, volatile defense substances in plants, their properties and activities. Acta Phytopath. Acad. Sci. Hung., **18**(1-3): 3-12.

MARUZZELLA, J.C., CHIARAMONTE, J.C. et GAROFALO, M.M. 1961. Effects of vapor of aromatic chemical on fungi. J. Pharm. Sci., **50**: 665-668.

MAXCY, R.B. 1983. Significance of residual organisms after substerilizing doses of gamma radiation: A review. J. Food Safety, **5**: 203-211.

McFADDIN, J.F. 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 2e éd., Williams et Wilkins, Baltimore/London, 527 pp.

MEHLMAN, M.A. et BOREK, C. 1987. Toxicity and biochemical mechanisms of ozone. Environ. Res., **42**: 36-53.

MORRIS, J.A., KHETTRY, A. et SEITZ, E.W. 1979. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. J. Amer. Oil Chem. Soc., **56**: 595-603.

NAITOH, S. 1993. Studies on the application of ozone in food preservation. Microbial properties of ozone in the gas phase to yeast. Bokin Bobai, **21**(6): 341-6.

NANDI, B. 1977. Effect of some volatile aldehydes, ketones, esters and terpenoids on growth and development of fungi associated with wheat grains in the field and storage. J. Plant Dis. Prot., **84**(2): 144-128.

NORDION INTERNATIONAL INC. Gammacell 220 High dose rate research irradiator. Kanata, Canada.

NORRMAN, J. 1968. Morphogenetic effects of some volatile organic compounds on *Pestalotia rhododendri*. Arch. Microbiol., **61**: 128-142.

NYMAN, B. 1969. The effect of various aliphatic aldehydes and related compounds on the growth of *Dipodascus aggregatus*. Physiologia Pl., **22**: 1322-1328.

OKAFOR, N. 1973. Microbial flora of gamma-irradiated vacuum-packed ground beef stored at different temperatures. J. Food Sci. Technol. India, **10**(3) 95-101.

ONDERDELIDEN, D. et STRACKEE, L. 1974. ESR as a tool for the identification of irradiated material. In Identification of Irradiated Foodstuffs. Commission of the European Communities, Report EUR 5126 d/e/f/i/n.

OSBORN, K.R. et JENKINS, W.A. 1992. Plastic Film Technology and Packaging Application. Lancaster, Penns : Technomic, 258 pp.

PILLETTE, L. 1990. Effects of ionizing treatments on packaging-food simulant combination. Pack. Technol. Sci., **3**: 17-20.

REDPATH, J.L. et PATTERSON, L.K. 1978. The effet of membrane fatty acid composition on the radiosensitivity of E.coli K-1060. Radiat. Res., **75**: 443-447.

RIPLEY, R.A. 1988. Regulatory control of food packaging materials in Canada. Presented at the Canadian Institute of Food and Science and Technology Annual Meeting, Winnipeg (29 mai au 1er juin).

ROJAS de GANTE, C. et PASCAT, B. 1990. Effect of ß-ionizing radiation on the properties of flexible packaging material. Pack. Technol. and Sci., **3**: 97-115.

SALEH, Y.G., MAYO, M.S. et AHEARN, D.G. 1988. Resistance of some common fungi to gamma irradiation. Appl. Env. Microbiol., **54**(8): 2134-2135.

SALGUEIRO, S.P., SA-CORREA, I. et NOVAIS, J.M. 1988. Ethanol-induced leakage in *Saccharomyces cerevisiae*: kinetics and relationship to yeast ethanol tolerance and alcohol fermentation productivity. Appl. Env. Microbiol., **54**: 903-909.

SCHAUENSTEIN, E., ESTERBAUER, H., ZOLLNER, H. 1977. Aldehydes in Biological Systems: Their Natural Occurence and Biological Activities. Pion, London, 205 pp.

SCHMIDTZ-LORENZ, W. et GRÜNEWALD, T. 1963. Einwirkung von elektronenstrahlen auf die oberflachenstruktur und lichtdurchlassigkeit von kunstoff-verpackungsfolien. Mitteilung. Kunstsoffe **53**: 281-289.

SEARLY, N.D. 1986. Wavelenght sensitivity of polymers. p.62-74. In International Conference on Advances in the Stabilisation and Controled Degradation of Polymers. Angelos V. Patsis, vol. 1, 122 pp.

SELMAN, J.D. 1982. How safe is irradiated food? Food Manufacture, **57**(4): 29-31-35-39.

SHEU, C.W., SALOMON, D., SIMMONS, J.L., SREEVALSAN, T. et FREESE, E. 1975. Inhibitory effects of lipophilic acids and related compounds on bacteria and mammalian cells. Antimicrob. Agents Chemother., **7**(3): 349-363.

SIMIC, M.G. 1983. Radiation chemistry of water soluble food components. Chap.1. In Preservation of Food by Ionizing Radiation. CRC Press, vol. 2, Florida, 343 pp.

SMITH, J.E. 1981. Microcycle conidiation. In The Fungal Spore: Morphogenetic Controls. Turian, G. et Hohl, H.R., Academic Press Inc., NY, 670 pp.

SOLTYS, M.A. 1963. Bacteria and Fungi Pathogenic to Man and Animals. Baillière, Tindall and Cox, 540 pp.

STIRLING, L.A. 1980. Microorganisms and environmental pollutants. Chap. 25, p.329-342. In Introduction to Environmental Toxicology. Guthrie, F.E. et Perry, J.J., Elsevier Applied Science, NY, 484 pp.

SUBRAMANI, S. 1991. MicroReview: Radiation resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol. Microbiol., **5**(10): 2311-2314.

TAKAMOTO, Y., MAEBA, H. et KAMIMURA, M. 1992. Changes in survival rate enzyme activities and in *Escherichia coli* with ozone. Appl. Microbiol. Biotechnol., **37**: 393-395.

TAUB, I.A., KAPRIELAN, R.A., HALLIDAY, J.W., WALKER, J.E., ANGELINI, P. and MERRIT, Jr, C. 1979. Factors affecting radiolytic effects in food. Radiat. Phys. Chem., **14**: 639-653.

TRIPP, G.E. 1959. Packaging for irradiated foods. Int. J. Appl. Radiat. Isot., **6**: 199-206.

URBAIN, W.M. 1986. Food Irradiation. Academic Press Inc., Hartcourt Brace Jovanich Publishers, 351 pp.

VARSANYI, I. 1972. The effect of radurizing doses on low density polyethylene films. Acta Aliment., **1**(3-4): 297-314.

VARSANYI, I., KISS, I. et FARKAS, J. 1972. Effect of radurization doses on polypropylene foil. Acta Aliment., **4**(3): 251-269.

VARSANYI, I. 1974. Effect of irradiation on the properties of some shrinking polymer films. Acta Aliment., **1**(1): 5-16.

VARSANYI, I. 1975. Investigation into the permeability of polymer membranes of food packaging quality to gas and water vapor after radiation treatment with radurizing doses. Acta Aliment., **4**(3): 251-269.

VASSEUR, J.P. 1991. Ionisation des Produits Alimentaires. Collection Sciences et Techniques Agroalimentaires, Technique et Documentation Lavoisier, Paris, 444 pp.

VAUGHN, S.F., SPENCER, G.F. et SHASHA, B.S. 1993. Volatile compounds from raspberry and strawberry fruit inhibit postharvest decay fungi. J. Food Sci., **58**(4): 793-796.

VOLLHARDT, K.P.C. 1987. Traité de Chimie Organique. Traduit par Paul Depovere (1990), Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Montréal, Canada, 1376 pp.

WALKER, J.D., et COLWELL, R.R. 1976. Long chain n-alkanes occuring during microbial degradation of petroleum. Can. J. Microbiol., **22**: 886-891.

WENLIAN, D., HAMILTON-KEMP, T.R., NIELSEN, M.T., ANDERSEN, R.A., COLLINS, G.B. et HILDEBRAND, D.F. 1993. Effects of six-carbon aldehydes and alcohols on bacterial proliferation. J. Agric. Food Chem., **41**: 500-510.

WENXIU, C., GOLDMAN, J.P. et SILVERMAN, J. 1985. Radical termination rate constants and mechanical properties of gamma-irradiated isotactic propylene with some additives. Radiat. Phys. Chem., **25**: 317-321.

WHO (World Health Organization). 1981. Wholesomeness of Irradiated Food. Geneva. World Health Organisation Technical Report Series No. 659.

WILSKI, H. 1987. The radiation induced degradation of polymers. Int. J. Radiat. Appl. Instrum., Part C. Radiat. Phys. Chem. **29**: 1-4.

WOLFE, S.K. 1980. Use of CO and CO_2-enriched atmospheres for meats, fish and produce. Food Technol., **43**: 55-58, 63.

WORM, K.H, KLIMCZAK, U. et SCHULTE-FROHLINDE, D. 1993. Radiosensitization and radioprotection of *E. coli* by alcohols. Int. J. Radiat. Biol., **64**(5): 485-495.

YANO, T. 1990. Physical properties and microbiology of foods. In Food Packaging. Kadoya, T. Academic Press Inc., San Diego, USA.

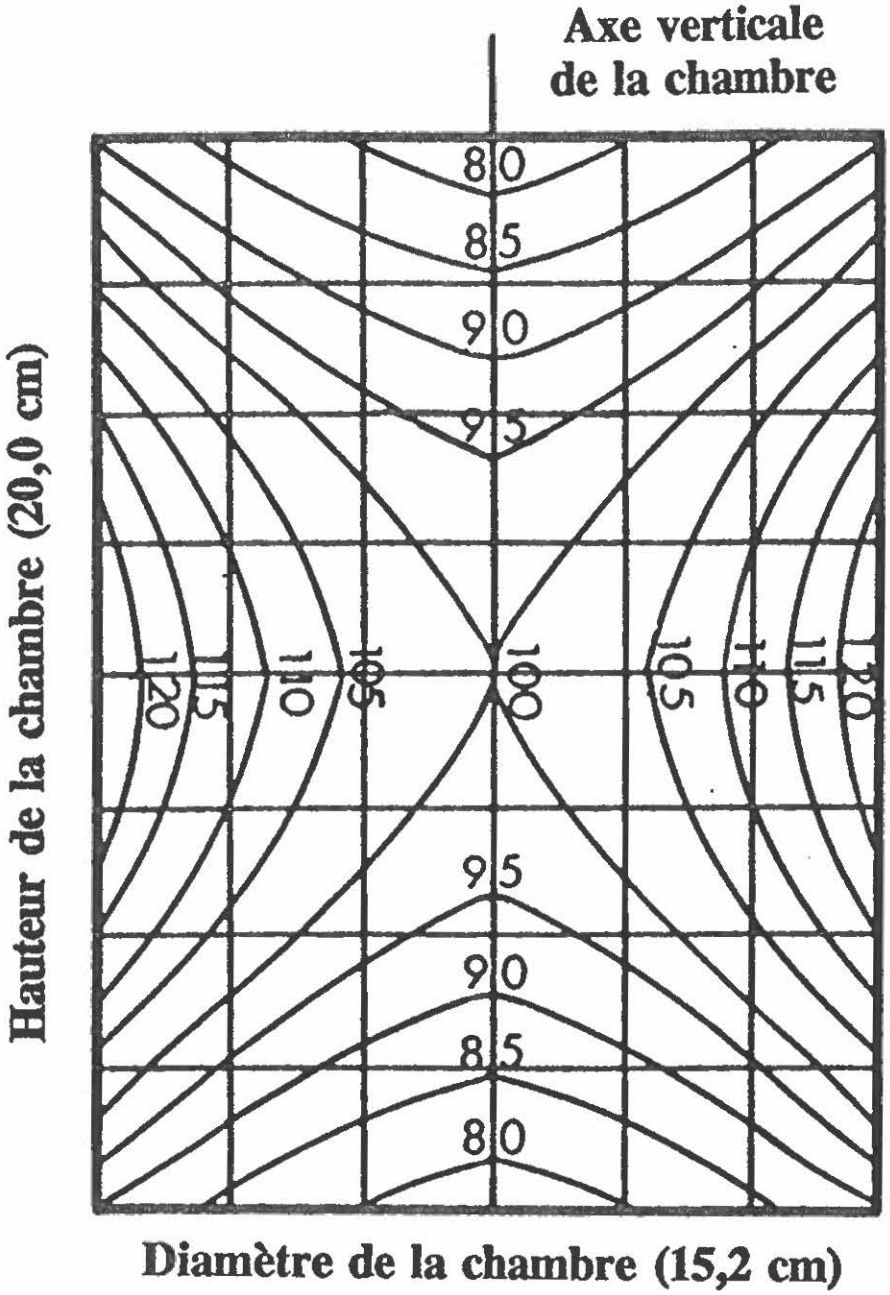
ZERINGUE, H.J.(Jr) et BHATNAGAR, D. 1994. Effects of neem leaf volatils on submerged cultures of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. Appl. Env. Microbiol., **60**(10): 3543-3547.

ANNEXE

Tableau 13 : **Liste des standards externes chromatographiés par GC-FID.**

STANDARDS	TR
propanal	8.519
butanal/2mepropanal	9.112
1-propanol	9.218
2-Me-1-propanol	9.964
pentanal	10.593
1-butanol	11.030
3-Me-butanal	12.015
heptane	12.364
3-pentanone	12.065
4-Me-2-pentanone	14.154
3-Me-3-pentanol	14.786
4-Me-2-pentanol	15.164
1-pentanol	15.700
hexanal	16.963
octane	17.274
2-Et-1-butanol	18.630
5-Me-2-hexanone	19.204
1-hexanol	19.662
1-hexanol	19.704
4-heptanone	19.748
cyclohexanol	20.159
2-heptanone	20.363
heptanal	20.740
nonane	21.071
5-Me-3-heptanone	22.050
1-heptanol	22.861
2,6-diMe-4-heptanone	22.941
1-décène	23.569
décane	23.787
octanal	23.816
1-octanol	25.597
1-undécène	26.249
nonanal	26.480
undécane	26.499
1-dodécène	28.651
dodécane	28.820
10,11,12C ald	28.896
1-tridécène	30.900
tridécane	31.047
tétradécane	33.130
1-tétradécène	33.132
pentadécane	35.158
hexadécane	37.126

Figure 17 : Courbes isodoses GAMMACELL 220



(Nordion International inc.)

Modifications apportées aux milieux de culture

1. **Agar à base de Lait de Litmus** (lait tournesolé) (McFadden, 1980)

Modification: Ajout minimal d'agar (0,8%). Agar stérilisé séparément, évite la coagulation du lait écrémé.

Ingr.:

- Litmus milk (BBL).....100 g
- Agar.....8 g
- Eau osmose.....1 L

Procédure:

1- Dissoudre l'agar dans l'eau et faire bouillir (plaque chauffante ou brûleur Bunsen).

2- Laisser refroidir jusqu'à la température de 50°C.

3- Dissoudre 100 grammes de lait de litmus en poudre.

4- Stériliser 20 minutes à l'autoclave à 115°C.

2. **Agar pourpre** (McFadden, 1980)

Modification: Ajout d'agar (1,5%). Solutions de sucres stérilisées séparément, évite la réaction de Maillard pour certains sucres.

Ingr.:

- PB base (bouillon) (BBL).....15 g
- Agar.....15 g
- Eau osmosée.....1 L

Procédure:

A. Préparation de la gélose sans sucre:

1- Dissoudre le tout dans l'eau et faire bouillir (plaque chauffante ou brûleur Bunsen).

2- Autoclaver (121°C/15 minutes).

3- Répartir dans les bouteilles de 500 ml, 310 ml de gélose (usage ultérieur).

4- Laisser gélifier en inclinant la bouteille.

B. Filtration des sucres:

Ingr.: Solution à 16,5%

- Sucre.....16.5 g
- Eau osmose.....100 ml

Liste des sucres: *C. albicans* (1), *P. fragi* (2)

- Glucose (1 et 2)
- Maltose (1 et 2)
- Galactose (1 et 2)
- Mannose (1 et 2)
- Saccharose (1)
- Fructose (1)
- Tréhalose (1)
- Lactose(1)

Procédure:

1- Stériliser un montage à filtration.

2- Dissoudre le sucre dans l'eau (plaque agitatrice).

3- Installer le filtre de 0.45 μm stérilement sur le montage, brancher le montage à la pompe et filtrer à faible débit.

4- Verser la solution dans une bouteille de 100 ml préalablement stérilisée.

C. Préparation des boîtes de Petri:

1- Faire fondre les bouteilles de gélose (4 min, 121°C) et laisser refroidir à 50°C (bain marie).

2- Ajouter 20 ml de solution sucrée (16,5%) par bouteille de 310 ml.

3- Répartir la gélose dans une quinzaine (15) de boîtes de Petri (pour une bouteille de 330 ml) sous la hotte à flux laminaire et laisser sécher **5 à 10 minutes.**