



**HAL**  
open science

# Ecologie et diversité des bactéries thermophiles formant des spores dans les conserves alimentaires

Loïc Durand

► **To cite this version:**

Loïc Durand. Ecologie et diversité des bactéries thermophiles formant des spores dans les conserves alimentaires. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier 2, 2014. Français. NNT: . tel-01104210

**HAL Id: tel-01104210**

**<https://theses.hal.science/tel-01104210>**

Submitted on 16 Jan 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

Pour obtenir le grade de  
Docteur

Délivré par **Université Montpellier II**

Préparée au sein de l'école doctorale  
« Science des Procédés-Sciences des Aliments »

Et de l'unité mixte de recherche  
Sécurité et qualité des produits d'origine végétale,  
INRA – UAPV

Spécialité : **Biotechnologie, Microbiologie**

Présentée par **Loïc DURAND**

**Ecologie et diversité des bactéries  
thermophiles formant des spores dans les  
conserves alimentaires**

Soutenance prévue le 18 février 2014 devant le jury composé de

|                     |                               |                                       |                          |
|---------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| M. Georges DAUBE    | Professeur                    | Université de Liège                   | Rapporteur               |
| Mme Monika COTON    | Maître de conférences-<br>HDR | Université de Bretagne<br>Occidentale | Rapporteur               |
| Mme Sabine GALINDO  | Professeur                    | Université de Montpellier             | Examineur                |
| Mme Stella PLANCHON | Chef de projet                | CTCPA                                 | Examineur                |
| Mme Fabienne REMIZE | Professeur                    | Université de la Réunion              | Directeur de thèse       |
| M. Frédéric CARLIN  | Directeur de recherche        | INRA                                  | Co-Directeur de<br>thèse |



*À mes parents, à mes frères, pour ma famille*



## Remerciements

Je remercie sincèrement Georges DAUBE et Monika COTON pour avoir accepté d'évaluer le fruit de trois années de dur labeur ainsi que tous les membres du jury.

Je souhaite remercier Christian DIVIN d'avoir accepté le projet DIVERSITHER qui a donné naissance à ce fabuleux projet de thèse.

Je remercie Christophe N'GUYEN THE et Catherine RENARD pour m'avoir accueilli au sein de l'unité.

J'adresse toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Fabienne REMIZE, pour m'avoir encadré et suivi de si près pendant ces trois années de thèse malgré les quelques 8860 kms qui nous séparaient. Je n'oublierai jamais ce fameux jour où, sur les routes Bretonnes, tu m'as annoncé ton départ pour la Réunion. Nous étions en voiture, il faisait gris, et nous étions perdus à cause d'un réseau GPS introuvable. Tu as su néanmoins m'orienter de la meilleure des façons en me donnant de précieux conseils, en partageant tes connaissances et tes compétences mais également grâce à tes encouragements à travers les nombreuses réunions Skype. Merci de m'avoir accompagné, et même parfois traîné, jusqu'au but ultime que je m'étais fixé le jour où j'ai déposé ma candidature pour la thèse, l'obtention du grade de Docteur en Sciences.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à mon co-directeur de thèse Frédéric CARLIN. Merci pour les connaissances scientifiques que vous m'avez transmises tout le long de ces trois années de thèse. Que dire de plus d'une personne qui vous présente à tous ses collègues non pas en tant que thésard, mais en tant que « Champion du monde de boule lyonnaise moins de 23 ans » ? Une expression symbolique me vient à l'esprit : boire le calice jusqu'à la lie.

Je voulais remercier particulièrement Marie-Hélène GUINEBRETIERE pour son aide précieuse dans la réalisation des méthodes de typage. Tu as su trouver la force nécessaire dans les moments pénibles de ta vie pour me guider vers une perfection d'interprétation des gels d'électrophorèse. Merci d'avoir pris le temps de me répondre aussi rapidement quand j'en avais le plus besoin.

Merci également à Stéphane André de la CECAB pour son accueil et sa disponibilité lors de notre visite dans l'usine de transformation de légumes du Faouët mais également pour avoir fait le déplacement pour assister à ma soutenance de thèse.

Sur un air de Michel Delpech, bien connu pour motiver les troupes dans les moments difficiles, je chante de vive voix pour adresser tous mes remerciements à Stella PLANCHON, le meilleur chef de projet originaire de Lozère que je connaisse. Un roman ne serait pas de trop pour narrer les supers moments passer dans ce bureau en ta compagnie. Nos discussions sur la « théorie des poignets », les fous rires partagés et bien évidemment les heures de travail passées devant l'écran d'ordinateur sont autant de moments inoubliables qui ont fait que cette thèse se soit déroulée dans les meilleures conditions possibles.

Je remercie toute l'unité EMaiRIT'S et son chef Stéphane pour la bonne humeur quotidienne et pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté durant ces trois années. Je vais particulièrement remercier Eddy et son humour de premier âge, Barbara la mamie au grand cœur et Benoît pour ces exploits tant sportif sur le vélo que professionnel avec le fabuleux lâché de capillaires au fond du bain-marie.

Un merci particulier à l'ensemble du personnel du CTCPA : Sarah pour nos discussions interminables et les litres de café et thés bus durant les pauses, Willy mon « sparring-partner » dans l'ascension du Mont Ventoux, Eric pour les parties de poker, Virginie pour son aide à la photocopieuse, Patricia, Géraldine, Elisabeth et sans oublier bien sûr Josette, la femme qui parlait plus vite que sa langue.

Je n'oublie pas de remercier toutes les personnes de l'INRA qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse. La joie et la bonne humeur qui régnaient dans les locaux ont rendu mes nombreuses visites toujours aussi agréables.

Une grosse pensée à tous mes amis que j'ai connu à mes débuts de vie étudiante à Clermont-Ferrand et qui sont aujourd'hui mes « VP » et « MC » les plus fidèles. José, Titi, Jeannot, John, Fred, Coralie, Marylou, grâce à vous, mes week-ends festifs m'ont permis de décompresser et d'éliminer le stress accumulé notamment avec l'aide de Paul qui a toujours su nous rassembler en commençant par les soirées du Rabelais.

Enfin je ne remercierai jamais assez les deux personnes qui m'ont permis d'arriver à ce stade de ma vie, Papa et Maman. Merci de m'avoir donné la possibilité de réaliser mon projet. Merci d'avoir toujours cru en moi, en mes capacités quand moi je doutais des miennes. Merci de m'avoir soutenu pendant ces huit années d'études. Et bien évidemment merci à Cédric et Fabien, Dise et Beso, mes deux frères, mes deux amis, mon sang, ma vie.

La meilleure pour la fin, sans doute la plus méritante, *Mathilde*. Tu as su faire preuve de patience, tu as réussi à me supporter dans les moments difficiles, à me faire confiance dans les moments de doute, à me rendre la vie quotidienne la plus agréable possible quand bien même je ne le méritais pas. Je te remercie infiniment de m'avoir soutenu et encouragé sans compter. Merci pour toutes les concessions que tu as fourni pour ma réussite, merci d'avoir été là pour tous les moments difficiles. De tout mon cœur, Merci.





**Table des matières**

|  |    |
|--|----|
| Avant propos .....   | 1  |
| Chapitre 1 .....   | 5  |
| Etude bibliographique .....  | 5  |
| 1. Qualité microbiologique des conserves.....  | 5  |
| 1.1 Généralités sur la conserve.....   | 5  |
| 1.1.1 Historique .....   | 5  |
| 1.1.2 Le procédé de fabrication .....  | 7  |
| 1.1.3 Les qualités de la conserve.....   | 9  |
| 1.1.4 Données économiques.....   | 11 |
| 1.1.5 Méthodologie pour assurer la sécurité des aliments.....                                  | 11 |
| 2. Origine des spores dans les produits alimentaires.....                                      | 14 |
| 2.1 Caractéristiques des spores.....   | 14 |
| 2.1.1 Généralités.....   | 14 |
| 2.1.2 Sporulation et germination .....   | 14 |
| 2.1.3 Propriétés et structure des spores .....   | 17 |
| 2.1.4 Thermorésistance .....   | 20 |
| 2.2 Espèces bactériennes principalement responsable des non-stabilités .....                   | 24 |
| 2.2.1 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....  | 26 |
| • Caractéristiques de croissance .....   | 26 |
| • La sporulation .....   | 27 |
| • La thermorésistance.....   | 28 |
| 2.2.2 <i>Moorella thermoacetica</i> .....  | 29 |
| • Caractéristiques de croissance .....   | 30 |
| • La sporulation .....   | 30 |
| • Thermorésistance.....  | 31 |
| 2.3 L'écologie microbienne des bactéries formant des spores sur les lignes de production ..... | 31 |
| 3. Les outils de biologie moléculaire pour l'étude de la diversité.....                        | 33 |
| 3.1 Généralités.....   | 33 |
| 3.2 Les méthodes basées sur l'analyse des profils de migration des fragments d'ADN..           | 35 |
| 3.2.1 Électrophorèse sur Gel en Champ Pulsé (PFGE).....  | 35 |
| • Principe.....  | 35 |
| • Avantages et inconvénients .....   | 37 |
| • Applications.....  | 37 |
| 3.2.2 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) .....                      | 38 |
| • Principe.....  | 38 |
| • Avantages et inconvénients .....   | 40 |
| • Applications.....  | 40 |
| 3.2.3 Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) .....                                    | 40 |
| • Principe.....  | 40 |
| • Avantages et inconvénients .....   | 42 |
| • Applications.....  | 42 |
| 3.2.4 rep-PCR .....  | 43 |
| • Principe.....  | 43 |
| • Avantages et inconvénients .....   | 44 |
| • Applications.....  | 45 |
| 3.2.5 Analyse de plusieurs loci VNTR (MLVA) .....  | 45 |
| • Principe.....  | 45 |

---

|   |    |
|---|----|
| • Avantages et inconvénients .....  | 46 |
| • Applications.....   | 47 |
| 3.2.6 Amplification des fragments issus de restriction enzymatique (AFLP) ..... | 48 |
| • Principe.....   | 48 |
| • Avantages et inconvénients .....  | 50 |
| • Applications.....   | 50 |
| 3.3 Les méthodes basées sur le séquençage des gènes.....                        | 51 |
| 3.3.1 Typage à partir de gènes portés par plusieurs loci (MLST).....            | 51 |
| • Principe.....   | 51 |
| • Avantages et inconvénients .....  | 51 |
| • Applications.....   | 52 |
| 3.3.2 Séquençage de régions intergéniques (MST).....                            | 52 |
| • Principe.....   | 52 |
| • Avantages et inconvénients .....  | 53 |
| • Applications.....   | 53 |
| 3.4 Les méthodes basées sur l'hybridation ADN.....                              | 54 |
| 3.4.1 Hybridation ADN-ADN.....  | 54 |
| • Principe.....   | 54 |
| • Avantages et inconvénients .....  | 55 |
| • Applications.....   | 55 |
| 3.4.2 Hybridation sur puces ADN.....  | 55 |
| • Principe.....   | 55 |
| • Avantages et inconvénients .....  | 56 |
| • Application .....   | 56 |
| Chapitre 2 .....  | 57 |
| Matériel et Méthodes.....   | 57 |
| 1.1 Les souches et les conditions de cultures .....                             | 57 |
| 1.1.1 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> .....                               | 57 |
| 1.1.2 <i>Moorella thermoacetica/thermoautotrophica</i> .....                    | 57 |
| 1.2 Protocoles d'extraction d'ADN génomique.....                                | 58 |
| 1.2.1 Extraction d'ADN par la méthode InstaGene™ .....                          | 58 |
| 1.2.2 Extraction d'ADN par la méthode au phénol/chloroforme.....                | 59 |
| 1.3 Typage moléculaire .....  | 59 |
| 1.3.1 La méthode M13-PCR .....  | 59 |
| 1.3.2 La méthode REP-PCR.....   | 60 |
| 1.3.3 La méthode MLVA .....   | 61 |
| 1.3.4 Séquençage du gene panC.....  | 61 |
| 1.4 Caractérisation phénotypique.....   | 62 |
| 1.4.1 Croissance à différents pH et Température .....                           | 62 |
| • <i>G. stearothermophilus</i> .....  | 62 |
| • <i>M. thermoacetica/thermoautotrophica</i> .....                              | 63 |
| 1.4.2 Croissance à différentes concentrations de chlorure de sodium .....       | 63 |
| 1.4.3 Résistance aux antibiotiques .....  | 63 |
| 1.4.4 Sporulation et thermorésistance .....                                     | 64 |
| 1.5 Etude de l'écologie microbienne d'une ligne de production industrielle..... | 64 |
| 1.5.1 Echantillonnage.....  | 64 |
| 1.5.2 Préparation des échantillons pour l'analyse microbiologique.....          | 66 |
| 1.5.3 Dénombrement des spores anaérobies .....                                  | 66 |

|  |     |
|--|-----|
| 1.5.4 Prévalence de <i>G. stearotherophilus</i> , <i>M. thermoacetica/thermoautotrophica</i> et <i>Thermoanaerobacterium</i> spp. ....   | 67  |
| Chapitre 3 .....   | 69  |
| 1. Etude de la diversité génétique et phénotypique de <i>Geobacillus stearotherophilus</i> responsable d'altération des conserves .....  | 69  |
| 1.1 Objectifs et choix méthodologiques .....   | 69  |
| 1.2 Principaux résultats .....   | 70  |
| 2. Article 1: Genotypic and phenotypic characterization of foodborne <i>Geobacillus stearotherophilus</i> .....  | 73  |
| 2.1 Abstract .....   | 73  |
| 2.2 Introduction .....   | 74  |
| 2.3 Materials and methods .....  | 75  |
| 2.3.1 Strains and culture conditions .....   | 75  |
| 2.3.2 Genetic group and diversity .....  | 76  |
| • DNA extraction .....   | 76  |
| • M13-PCR.....   | 76  |
| • REP-PCR analysis .....   | 77  |
| • panC sequencing.....   | 77  |
| • Electrophoresis and data analysis.....   | 78  |
| 2.3.3 Growth studies.....  | 78  |
| • Growth at different temperatures and pH.....   | 78  |
| • Growth at different sodium chloride concentrations .....   | 79  |
| 2.3.4 Spore production and evaluation of spore heat resistance .....   | 79  |
| • Spore production and percentage of sporulation.....  | 79  |
| • Spore heat resistance and curve fitting with mathematical models.....  | 80  |
| 2.3.5 Statistical analysis .....   | 81  |
| 2.4 Results and discussion.....  | 81  |
| 2.4.1 Genetic diversity of <i>G. stearotherophilus</i> strains examined with M13-PCR, REP-PCR and panC sequencing .....  | 81  |
| 2.4.2 Growth of selected <i>G. stearotherophilus</i> strains at a range of temperature, pH and NaCl concentrations and rates of sporulation.....   | 85  |
| 2.4.3 Heat-resistance of selected <i>G. stearotherophilus</i> strains.....   | 88  |
| 2.4.4 Relationship between genotypic group and isolate origin or phenotypic diversity .....  | 91  |
| 2.5 Conclusions .....  | 91  |
| Chapitre 4 .....   | 97  |
| 1. Etude de la diversité génétique et phénotypique de <i>Moorella thermoacetica/thermoautotrophica</i> isolées des conserves non-stables.....  | 97  |
| 1.1 Objectifs et choix méthodologiques .....   | 97  |
| 1.2 Principaux résultats .....   | 98  |
| 2. Article 2: New insights in the physiology of the highly heat resistant spore forming bacteria <i>Moorella thermoacetica / thermoautotrophica</i> involved in spoilage of canned foods ..... | 99  |
| 2.1 Abstract .....   | 99  |
| 2.2 Introduction .....   | 100 |
| 2.3 Material and methods .....   | 101 |
| 2.3.1 Strains and culture conditions .....   | 101 |
| 2.3.2 Genetic study.....   | 104 |
| • M13-PCR typing method .....  | 104 |
| • MLVA typing method .....   | 106 |

---

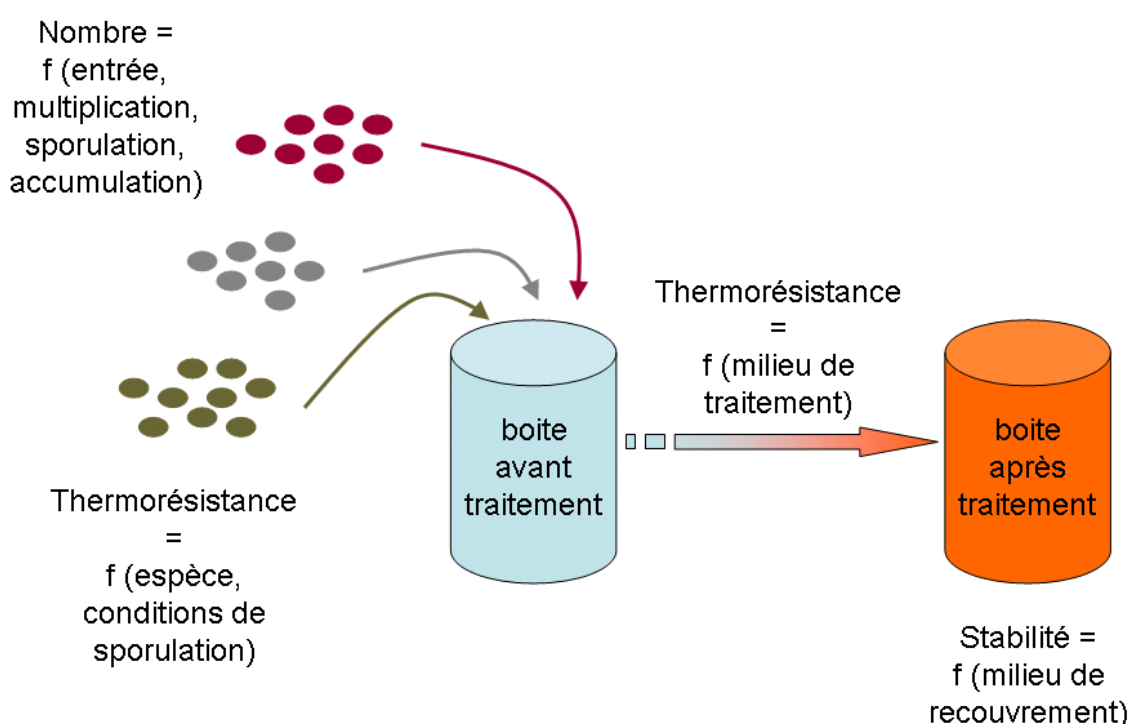
|   |     |
|---|-----|
| 2.3.3 Phenotypic study .....  | 107 |
| • Growth at different temperatures and pH.....  | 107 |
| • Antibiotic resistance .....   | 108 |
| • Spore production and heat resistance .....  | 108 |
| 2.3.4 Statistical analysis .....  | 108 |
| 2.4 Results .....   | 109 |
| 2.4.1 Molecular typing of isolates .....  | 109 |
| • M13-PCR typing results .....  | 109 |
| • MLVA typing results.....  | 111 |
| 2.4.2 Phenotypic characterization of isolates .....   | 112 |
| • Temperature and pH range for growth .....   | 112 |
| • Antibiotic resistance .....   | 114 |
| • Spore heat resistance .....   | 115 |
| 2.5 Discussion .....  | 116 |
| Chapitre 5 .....  | 121 |
| 1. Les voies de contamination des bactéries formant des spores sur une ligne de production de légumes dans une conserverie française.....                       | 121 |
| 1.1 Objectifs et méthodologie .....   | 121 |
| 1.2 Principaux résultats .....  | 121 |
| 2. Article 3: Contamination pathways of spore-forming bacteria in a vegetable cannery. 123  |     |
| 2.1 Abstract .....  | 123 |
| 2.2 Introduction .....  | 124 |
| 2.3 Material and methods .....  | 125 |
| 2.3.1 Sampling.....   | 125 |
| 2.3.2 Sample preparation for microbiological analysis.....  | 128 |
| 2.3.3 Anaerobic spore counts .....  | 129 |
| 2.3.4 Prevalence of <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Moorella thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> and <i>Thermoanaerobacterium</i> spp..... | 129 |
| 2.3.5 <i>G. stearothermophilus</i> M13-PCR typing .....   | 130 |
| 2.3.6 Statistical analyses.....   | 131 |
| 2.4 Results .....   | 131 |
| 2.4.1 Enumeration of thermophilic anaerobic spores (TAS) and highly-heat-resistant (HHR) TAS .....  | 131 |
| 2.4.2 Temperature measurement along the processing chain.....   | 134 |
| 2.4.3 Prevalence of <i>M. thermoacetica/thermoautotrophica</i> , <i>Thermoanaerobacterium</i> spp. and <i>G. stearothermophilus</i> .....                       | 135 |
| 2.4.4 Analysis of the diversity among <i>G. stearothermophilus</i> isolates with M13-PCR .....  | 137 |
| 2.5 Discussion .....  | 140 |
| Chapitre 6 .....  | 147 |
| Discussion générale.....  | 147 |
| Références bibliographiques .....   | 153 |
| Valorisation du travail de thèse .....  | 181 |

## Avant propos

**L**es aliments en conserves sont définis comme les denrées alimentaires périssables dont la conservation est assurée par un procédé associant le conditionnement dans un récipient étanche à l'eau et aux microorganismes ainsi qu'un traitement par la chaleur afin qu'ils demeurent stables à température ambiante. Les DLUO (Dates Limite d'Utilisation Optimale) proposées pour ce type de produits peuvent ainsi atteindre plusieurs années. Cette conservation de longue durée, associée à la préservation des qualités de l'aliment, est l'aboutissement de la recherche technologique sur les matériaux d'emballages, et sur les traitements thermiques. Ces derniers permettent la cuisson, mais aussi et surtout, la destruction ou l'inhibition de tout microorganisme qui serait capable de se développer dans le produit fini. Alors que les cellules végétatives sont rapidement détruites par la chaleur, l'inactivation des spores bactériennes nécessite des traitements d'intensité plus forte. La bactérie formant des spores et hautement pathogène *Clostridium botulinum* sert ainsi de référence internationale depuis près d'un siècle pour les produits non acides pour garantir l'objectif de sécurité sanitaire des produits (Esty and Meyer, 1922). Aujourd'hui, les valeurs stérilisatrices (VS) ciblées par les conserveurs sont choisies sur la base de la stabilité du produit fini. Leur détermination prend en compte les caractéristiques physico-chimiques des aliments, la charge initiale des contaminants microbiens avant traitement thermique et la thermorésistance de ces microorganismes (Figure 1) (CTCPA, 2005; Hornstra *et al.*, 2009). Ce choix de VS va bien au-delà de l'objectif de la sécurité sanitaire des produits, et jusqu'à des considérations commerciales, car les produits ne doivent pas présenter de risque de développement de microorganismes, même non pathogènes, et y compris lors de stockages prolongés à température plus élevée (jusqu'à 55°C).

Dans le cadre du contrôle qualité réalisé par les entreprises, des tests de stabilité des conserves sont effectués afin de détecter une modification du produit d'origine microbiologique. En support de ces contrôles qualité, le Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles (CTCPA) mène des projets de recherche collectifs aux services des industriels du secteur des aliments appertisés. Le CTCPA, Centre Technique Industriel qualifié Institut technique agro-industriel (ITAI) par le Ministère de l'agriculture, est régi par le code de la Recherche (articles L342-1 à L342-13). À ce titre, il réalise des missions d'intérêt général grâce à la taxe fiscale affectée versée par les fabricants français de produits en conserve et déshydratés. Ces missions se traduisent par l'anticipation et la participation aux évolutions

technologiques intéressant la profession en menant des programmes de recherche collective choisis par les professionnels, et soutenus par les pouvoirs publics. Chaque année, les entreprises ressortissant du CTCPA sont sollicitées afin de préparer le programme de recherche collective. En microbiologie, les recherches portent sur les microorganismes responsables de non-stabilité des conserves et sur les méthodes de détection et de quantification des bactéries et des spores responsables des non-stabilités. Ainsi, depuis de nombreuses années, le CTCPA mène des travaux sur les bactéries thermophiles formant des spores.



**Figure 1 : Les facteurs liés à l'instabilité des conserves (Rapport privé du CTCPA, 2010)**

Avant le traitement, deux facteurs vont influencer sur la stabilité de la conserve : le nombre de bactérie entrant et leur résistance à la chaleur. Pendant la stérilisation, la quantité de spores restante va dépendre de la thermorésistance des bactéries dans le milieu. Dans le produit appertisé, la stabilité va dépendre de la capacité des spores de bactéries à germer puis se développer dans le milieu de recouvrement.

Les bactéries thermophiles sont reconnues de longue date comme la cause majeure des non-stabilités des conserves (Ashton and Bernard, 1992; Denny and Corlett, 1992; Olson and Sorrells, 1992). Le trio constitué par les deux anaérobies *Moorella thermoacetica* (anciennement *Clostridium thermoaceticum*) et *Thermoanaerobacterium* spp. (anciennement

*Clostridium thermosaccharolyticum* et autres espèces thermophiles du genre) et l'aérobie-anaérobie facultative *Geobacillus stearothermophilus* (anciennement *Bacillus stearothermophilus*) est majoritairement responsable des cas de non-stabilité à 55°C (Ashton and Bernard, 1992; Dotzauer *et al.*, 2002; Carlier and Bedora-Faure, 2006; Carlier *et al.*, 2006; André *et al.*, 2013). Les autres espèces bactériennes thermophiles responsables de non-stabilité comprennent *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis* et *Clostridium thermobutyricum/thermopalmarium* (Feig and Stersky, 1981; Raso *et al.*, 1995). Une étude menée sur une période de 10 ans a permis de déterminer l'occurrence relative des bactéries thermophiles causant les non-stabilités à 55°C par type d'aliment (André *et al.*, 2013). La non-stabilité des conserves peut être reliée à (i) l'augmentation de la population initiale de spores thermorésistantes, (ii) à l'augmentation de la thermorésistance des populations de spores présentes avant traitement thermique, et (iii) à la capacité des bactéries à se développer dans l'aliment (Figure 1). Plus directement, ces caractères sont dépendants des espèces bactériennes présentes avant traitement thermique et de la diversité des caractères phénotypiques au sein de chaque espèce.

Afin de répondre aux attentes des industriels, un projet de recherche a été initié par le CTCPA en partenariat avec l'unité de microbiologie de l'INRA d'Avignon, UMR Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale (SQPOV). Cette thèse CIFRE (soutenue par l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) a pour but de caractériser au plan génétique et physiologique des bactéries thermophiles formant des spores thermorésistantes. Pour cela, le projet de recherche est axé d'une part sur l'acquisition de connaissances sur la physiologie et la diversité génétique d'isolats industriels disponibles dans la collection du CTCPA appartenant aux deux espèces formant des spores hautement thermorésistantes les plus fréquentes (*Geobacillus stearothermophilus* et *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica*) et d'autre part sur la détermination des flux de contamination et de la caractérisation de l'écologie des bactéries thermophiles formant des spores sur une ligne de production en conserverie de légumes.





# Chapitre 1

## Etude bibliographique

### 1. Qualité microbiologique des conserves

#### 1.1 Généralités sur la conserve

##### 1.1.1 Historique

La fabrication de conserves alimentaires est un procédé industriel qui a vu le jour en 1795. Son inventeur, Nicolas Appert, né le 17 novembre 1749 à Châlons-en-Champagne, était alors confiseur à Paris lorsqu'il réalisa qu'il était possible de conserver des aliments de façon quasi indéfiniment en les faisant chauffer à 100°C dans des récipients en verre hermétiquement clos en un temps donné. Testée par la Marine française, la conserve fut un franc succès. En effet, le scorbut, fléau qui décimait jusque-là les marins privés de vitamine C, disparut alors. Soucieux d'améliorer le quotidien de la population plutôt que de s'enrichir, Nicolas Appert ne songea pas à breveter son invention. Néanmoins, il obtint du gouvernement impérial une bourse pour son procédé universel de conservation à la condition qu'il publie le fruit de ses découvertes. Son ouvrage intitulé : *L'art de conserver pendant plusieurs années toutes les substances animales et végétales* (Appert, 1810) (Figure 2) a été traduit puis publié dans de nombreux pays tels que l'Allemagne, l'Angleterre, la Belgique et les Etats-Unis. Découverte en France, l'appertisation s'est très rapidement étendue et a été exploitée dans le monde entier au cours du XIX<sup>e</sup> siècle. Pierre Durand, un Français émigré au Royaume-Uni jugea le verre trop fragile et lourd et préconisa ainsi d'utiliser des emballages en fer étamé appelés aujourd'hui, fer-blanc. La boîte en métal a très rapidement remplacé les contenants en verre. A partir de là, les aliments appertisés ont pu se conserver quasi indéfiniment et être transportés sans risque de casse. L'appertisation associée à la boîte de métal devient à cette époque la solution d'avenir pour l'essor de la conserverie. Aujourd'hui, par décret français, sont considérées comme conserves « les denrées alimentaires, d'origine animale ou végétale périssable, dont la conservation est assurée par un procédé associant le conditionnement dans un récipient étanche aux liquides, aux gaz et aux microorganismes, à toute température inférieure à 55°C et un traitement par la chaleur » (Décret, n°55-241 (1955)).



**Figure 2 : Nicolas Appert, *L'art de conserver pendant plusieurs années toutes les substances animales et végétales* ([www.azal.fr](http://www.azal.fr)).**

Cette illustration a été imprimée sur un timbre de la poste française en 1955 à l'effigie de Nicola Appert. Elle témoigne de l'importance de ce personnage français rendu célèbre par son invention : la conserve alimentaire

Les techniques de fabrication ont progressé pour assurer plus de sécurité et une meilleure productivité avec également l'apparition de nouveaux matériaux qui ont permis à la boîte de conserve de poursuivre son évolution. Ainsi, l'aluminium et l'acier sans étain ont fait leur apparition dans les années 1970-1980 permettant le développement de nouvelles formes de boîte et l'élaboration d'ouvertures faciles. Longtemps considérée par certains comme un emballage basique et bas de gamme, la boîte de conserve en métal n'a cessé au contraire de démontrer sa modernité. La conserve a suivi son essor en adoptant de nouveaux emballages appertisables tels que les barquettes et bols en plastiques, operculés et micro-ondables ainsi que les sachets souples tels que les Doypacks® qui améliorent la praticité pour les consommateurs. Enfin, les avancées technologiques ont permis d'élaborer de nouveaux procédés de traitement en continu du produit en échangeurs, associés au conditionnement aseptique, principalement appliquées aux liquides alimentaires (surtout potages) avec l'émergence des emballages aseptiques en complexes carton/alu/PE de type Combiblock® ou Tetra Pak®.

### *1.1.2 Le procédé de fabrication*

La conserve, dont la qualité première est d'assurer la conservation des aliments, a d'autres avantages. Parmi ceux-ci, le souci de la fraîcheur des aliments nécessite que les conserveries se trouvent le plus souvent sur les lieux de production : près des champs et des vergers pour les fruits et légumes et dans les ports pour le poisson. Pour garder la fraîcheur des matières premières, le procédé d'appertisation s'effectue de façon très rapide et se déroule en plusieurs étapes. Un exemple de diagramme de fabrication est présenté Figure 3. Pour les légumes, le chargement arrivé à l'usine est pesé et fait l'objet d'une prise d'échantillons qui est analysée pour déterminer la qualité du produit. Les matières jugées conformes sont acheminées sur les lignes de fabrication pour y être nettoyées. Les légumes sont calibrés pour déterminer leur catégorie puis sont immergés quelques minutes dans de l'eau bouillante ou dans un bain de vapeur pour fixer la couleur, dégazer les tissus végétaux, stabiliser la masse (pour le respect du futur Poids Net Egoutté), détruire certaines enzymes qui pourraient altérer le produit avant la conservation et enfin éliminer les microorganismes sensibles à la chaleur : c'est l'étape du blanchiment. Les produits sont ensuite pesés et conditionnés dans les boîtes ou bocaux de différents formats. Pour compléter le remplissage des conserves de légumes, de l'eau salée ou un jus cuisiné (parfois sucré) est ajouté par débordement ou bien avec une juteuse sous vide (Figure 4). Enfin, la fermeture des emballages métalliques est assurée par le sertissage des couvercles, et celle des bocaux par capsulage, méthodes qui offrent une étanchéité totale (Figure 5). Ces dernières sont ensuite placées dans un stérilisateur ou un autoclave et soumises à des températures supérieures à 100°C, sous pression, pendant un temps précis. Ce procédé permet à la fois de cuire les aliments et de détruire la plupart des microorganismes ainsi que la plupart des toxines qui pourraient être présentes. Les conserves sont alors stockées dans de grands entrepôts en attendant d'être expédiées vers les magasins.

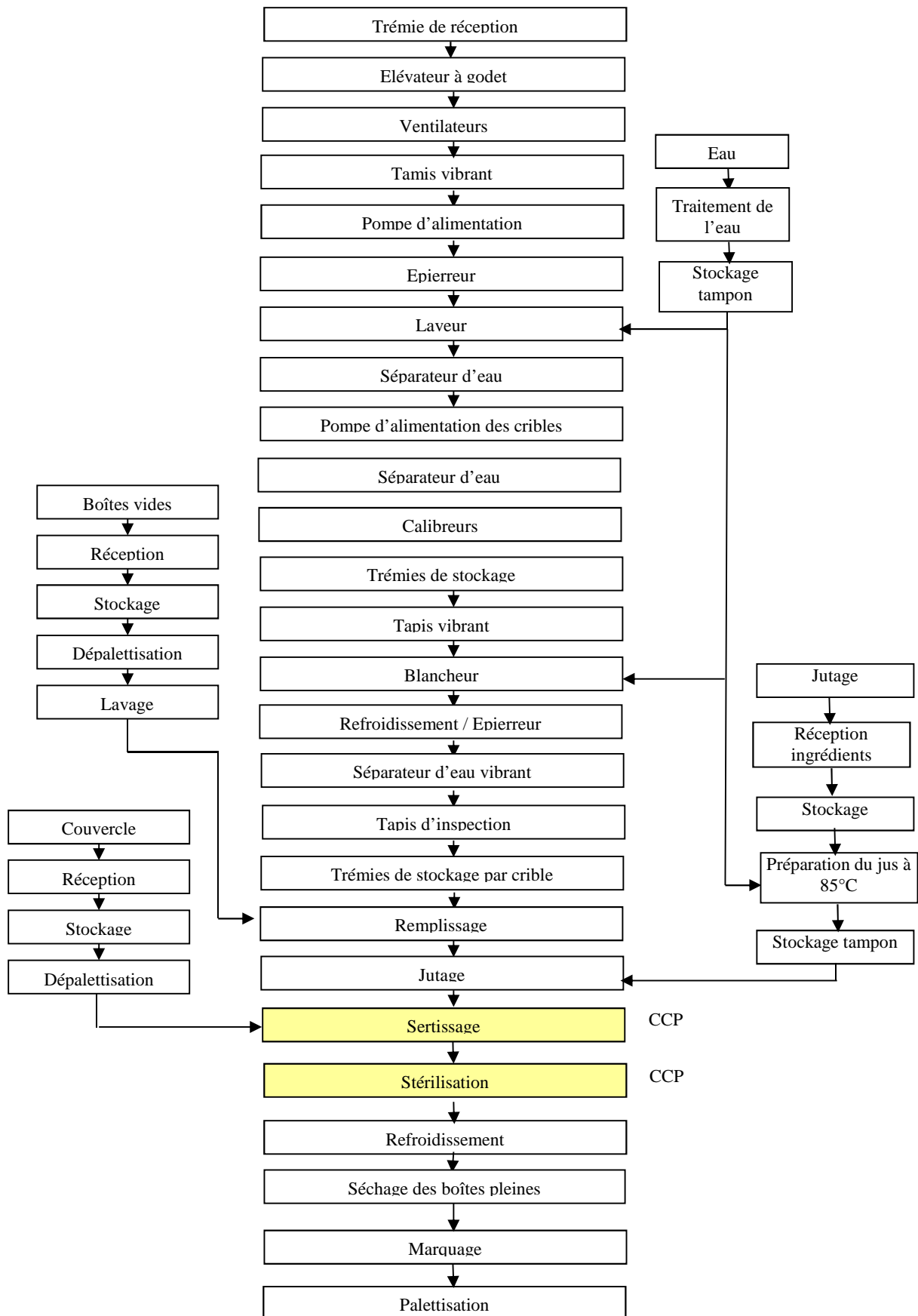
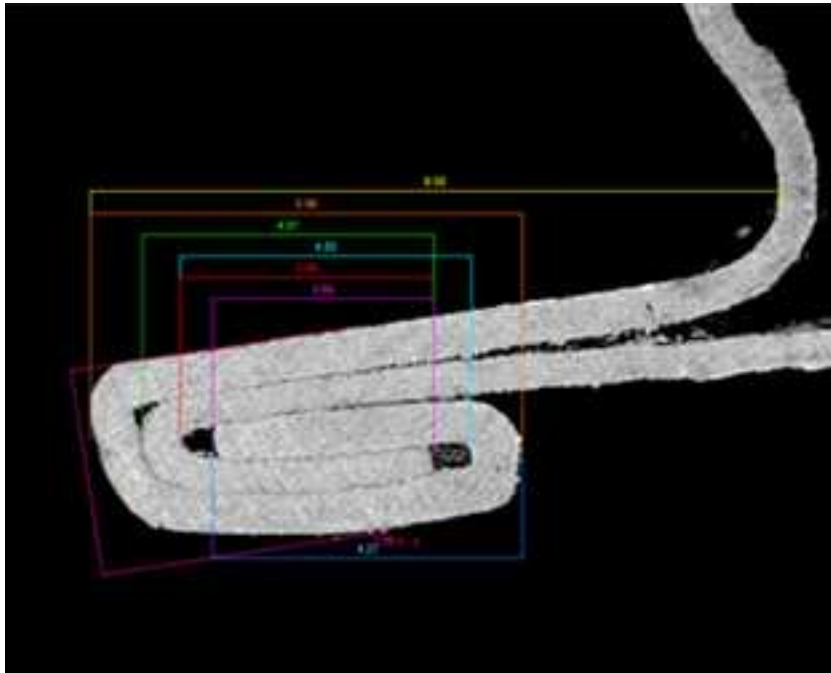


Figure 3 : Diagramme de production d'une ligne appertisée de petit pois en emballage métallique (GBPH, 1999)



**Figure 4 : Exemple d'une juteuse rotative sous vide (www.stvmachinery.it)**



**Figure 5 : Profil de sertis (photographie réalisée au CTCPA)**

### *1.1.3 Les qualités de la conserve*

La boîte métallique préserve le goût du produit pendant toute la durée de conservation et respecte parfaitement la saveur des recettes. Pourtant, certains considèrent que la nature industrielle du procédé serait antinomique avec l'image de fraîcheur et de l'authenticité associée au « naturel ». Or, le procédé de l'appertisation préserve en effet en tout point l'authenticité du produit grâce à l'absence d'additifs et de conservateurs. Par définition, il n'est besoin d'aucun produit conservateur dans la conserve. Le procédé d'appertisation suffit

à stabiliser le contenu. La conserve respecte le goût de la denrée originelle et préserve la couleur des aliments en raison de la non-transformation de la matière première en amont, y compris pour les plats cuisinés. De plus, la rapidité de traitement permet de conserver au produit un pourcentage élevé de ses qualités gustatives et nutritionnelles initiales. En effet, l'appertisation ne modifie en rien la teneur en protéines, lipides et glucides des aliments. Concernant la préservation des vitamines, dès l'origine de l'invention du procédé, le constat est sans équivoque puisque les marins nourris avec les conserves échappent au scorbut grâce à un apport suffisant de vitamine C. Certaines vitamines sont hydrosolubles telles que la vitamine C et les vitamines du groupes B. Une partie se retrouve donc dans l'eau de la boîte de conserve qu'il est fortement conseillé de consommer en l'intégrant aux préparations culinaires. En moyenne, les vitamines sont préservées à 70% dans les produits appertisés tandis que les produits du marché en perdent entre 17% et 47% lors de la cuisson ménagère. Les omégas 3, qui sont depuis quelques années mis en avant dans le traitement des maladies cardio-vasculaires, résistent bien, eux aussi, à l'appertisation (ADEPALE, 2011b).

La conserve permet de s'affranchir du rythme des saisons et, plus largement, de lisser les écarts entre les bonnes et les mauvaises récoltes. Aujourd'hui, le principe même de la conserve permet à chacun de disposer à tout moment de produit de la nature, de la culture, de l'élevage et de la pêche. D'ailleurs, le Programme national nutrition santé (PNNS, 2011), développé par le ministère de la Santé depuis 2001, incite les Français à inclure plus de fruits et de légumes dans leur alimentation quotidienne. Cependant, l'un des freins constatés à l'augmentation de cette consommation est le prix élevé des fruits et légumes frais et d'une durée de conservation courte. Ainsi, les recommandations du PNNS se veulent explicites et donnent une dimension qualitative sur les « au moins 5 fruits et légumes par jour » qui sont alors accompagnées de la mention « frais, en conserve ou surgelé ». Les guides et fiches du PNNS rappellent que les fruits et légumes en conserve ou surgelés sont souvent moins chers et ont aussi d'excellentes qualités nutritionnelles. De la même façon, lorsque le PNNS incite à essayer de manger du poisson au moins deux fois par semaine, il rappelle que cet apport peut se faire via les poissons frais, surgelés ou en conserve, rappelant que ces dernières formes sont moins chères et possèdent les mêmes qualités nutritionnelles que le poisson frais. Dans ce contexte, les produits en conserve se révèlent de précieux partenaires pour la bonne gestion de l'équilibre alimentaire d'un grand nombre de Français. L'innovation permanente de diversité de recettes, de formats d'emballage en métal, de facilité d'usage ainsi que les qualités nutritionnelles expliquent qu'aujourd'hui 99,7% des foyers français achètent des conserves et qu'ils en consomment 50 kg par habitant chaque année.

#### 1.1.4 Données économiques

En 2012, la filière des légumes en conserve en France représente 20 organisations de producteurs pour 29 sites de transformations. La culture de légumes destinés à l'industrie est étendue sur 75 000 ha pour une production annuelle de 9 millions de tonnes. Le marché de la conserve génère en France un chiffre d'affaires en moyenne de 5,2 milliards d'euros. Le poids économique de la conserve est indissociable de son poids social. Les conservateurs emploient environ 15 000 personnes en France (UNILET, 2012). Plus de 3 milliards de boîtes métallique pour l'alimentation humaine sont produites en France correspondant à 2,3 millions de produits appertisés qui sont consommés chaque année (ADEPALE, 2011a).

#### 1.1.5 Méthodologie pour assurer la sécurité des aliments

Les traitements thermiques appliqués sur les conserves permettent d'éliminer la plupart des microorganismes présents dans l'emballage avant l'appertisation. Les barèmes de stérilisation tiennent compte de plusieurs paramètres (Fellow, 1996; Zuber *et al.*, 2008) pour définir la VS (valeur stérilisatrice) appliquée au minimum « à cœur » du produit. Cette valeur représente une intensité de traitement thermique cumulé et s'exprime en minutes sur une échelle internationale. Elle est calculée comme un temps théorique équivalent de chauffage d'un produit à une température constante de référence, en intégrant la durée des différentes phases comportant montée en température, plateau et refroidissement, nécessaire pour réduire la charge microbienne dans les proportions voulues. La température dont il faut tenir compte dans tous ces calculs est la température « à cœur » des produits. Cela suppose l'introduction de sondes à l'intérieur des produits traités lors de la mise au point et de la validation des barèmes. Les sondes actuelles comportent des enregistreurs en continu des couples temps/température, dont le traitement informatique donne par calcul la Valeur Stérilisatrice (ou Fo). La température de référence pour le calcul de la valeur stérilisatrice est de 121,1°C et le facteur z, qui correspond à la variation de température entraînant une variation de la durée de réduction décimale (D) de la population d'un facteur 10, prend la valeur 10°C. La valeur stérilisatrice représente donc le temps théorique de chauffage à cette température pour l'élimination des bactéries de référence et de leurs spores. En conserverie de légumes, *G. stearothermophilus* est souvent choisie comme la bactérie de référence (Document interne CTCPA). La VS calculée pour cette bactérie est suffisamment élevée pour détruire en théorie toutes les autres espèces présentes dans le produit y compris les spores de *C. botulinum* protéolytiques. Par ailleurs, le pH d'un produit, sa teneur en sel, sa teneur en matières grasses,



son activité de l'eau ( $a_w$ ) sont autant de facteurs qui vont influencer sur la thermorésistance des spores et leur capacité à se développer dans l'aliment. Par exemple, la spore de *C. botulinum* est incapable de germer à des pH inférieurs ou égaux à 4,5 (Peck *et al.*, 2011).

Pour s'assurer que les aliments commercialisés sont sains et surs, les industriels effectuent sur les conserves des tests de stabilités sur chaque lot de fabrication. Cette vérification de l'efficacité du traitement thermique est réalisée par le biais d'une épreuve d'incubation réglementée couramment appelé « contrôle de la stabilité ». Cette méthode consiste à incuber plusieurs conserves du même lot à des températures différentes et à des durées plus ou moins longues en fonction de la nature du produit, de la réglementation et de la méthode appliquée. En France, le contrôle de la stabilité est généralement effectué en routine selon la norme NF V08-408 (AFNOR, 1997b) qui est une simplification de la norme de référence NF V08-401 (AFNOR, 1997a). Les tests de stabilité par incubation sont réalisés sur les produits peu acides ( $\text{pH} \geq 4,5$ ) pendant 7 jours à 37°C et pendant 7 jours à 55°C, afin de détecter des modifications du produit par altération d'origine microbienne (AFNOR, 1997b). Le test de stabilité à 37°C est imposé par la réglementation française pour valider l'absence de développement de microorganismes mésophiles revivifiables dans les produits. Cette référence vient de la capacité de *C. botulinum* à se développer dans ces conditions. La non-conformité à ce test entraîne la destruction du lot concerné car le risque pathogène est potentiellement présent. Cette réglementation n'est cependant pas la même dans tous les pays (Table 1). Le test d'incubation à 35°C ou 37°C est universellement reconnu pour le contrôle de la stabilité des conserves appertisées.

En complément du test libératoire de stabilité à 37°C, la validation de la stabilité biologique à 55°C, qui n'est pas exigible réglementairement, est très largement utilisée comme indicateur global d'hygiène des procédés par les conserveries. Par ailleurs l'exportation de conserves (transport par bateau, pays de destination à climat tropical, etc..), ou le stockage en période estivale, expose les conserves à des températures de stockage élevées. Il convient donc de s'assurer de leur stabilité en pratiquant dans ce cas le test de stabilité à 55°C pour mettre en évidence l'absence de croissance de microorganismes sporulés thermophiles.

La présence des spores dans les conserves alimentaires est un réel problème pour les industriels lorsque ces dernières sont activées et se développent dans le produit. Ainsi, des connaissances sur les spores et leurs origines s'avèrent être indispensables pour mieux maîtriser leur contamination dans les aliments en conserves.

**Table 1: Législation appliquée dans différents pays de l'Union Européenne et des Etats-Unis d'Amérique**

| Pays               | Législation  | Test d'incubation                      | Recommandations <sup>a</sup>  |
|--------------------|--|--|---|
| Codex Alimentarius | Code d'usages des conserves CAC/RCP 23 rev 2 1993                      | 10 à 14 jours à 37°C                   | Le test à 55°C n'est utilisé que pour les produits destinés aux pays chauds       |
| Codex Alimentarius | Code d'usages des conserves conditionnées aseptiquement CAC/RCP40 1993 | 10 jours à 35°C                        |   |
| France             | Norme AFNOR NF V08 401<br>Norme AFNOR NF V08 408                       | 7 jours à 37°C<br>7 jours à 55°C       |   |
| Union Européenne   | Règlement 852/2004   | Aucun                                  | Référence aux normes internationales reconnues (comme le CODEX)                   |
| USA                | FDA 21 CFR part113<br>USDA 9 CFR part 318.309                          | 10 jours à 35°C                        |   |
| Canada             | ACIA guide d'inspection des produits transformés                       | 10 jours à 37°C                        |   |
| Royaume Uni        | Pas de réglementation spécifique<br>Guide de bonnes pratiques          | 14 jours à 37°C<br>5 à 14 jours à 55°C | Le test à 55°C est recommandé pour les produits destinés aux pays chauds          |
| Pays-Bas           | Règlement du produktschap d'août 1989                                  | 7 jours à 37°C<br>ou 10 jours à 35°C   | Le test à 55°C n'est utilisé que pour les produits destinés aux pays chauds       |
| Allemagne          | Pas de réglementation spécifique                                       | Aucun                                  | Les laboratoires de contrôle pratiquent 10 jours à 35°C ou 37°C                   |
| Espagne            | Décret Royal 2420/1978   | Aucun                                  | Les laboratoires de contrôle pratiquent 14 jours à 35°C ou 37°C                   |
| Italie             | Décret n°155 du 26/05/1997   | Aucun                                  | Les laboratoires officiels pratiquent 14 à 20 jours à 32°C et 7 à 10 jours à 55°C |

<sup>a</sup> D'après une étude réalisée par le service documentation du CTCPA en 2005

## 2. Origine des spores dans les produits alimentaires

### 2.1 Caractéristiques des spores

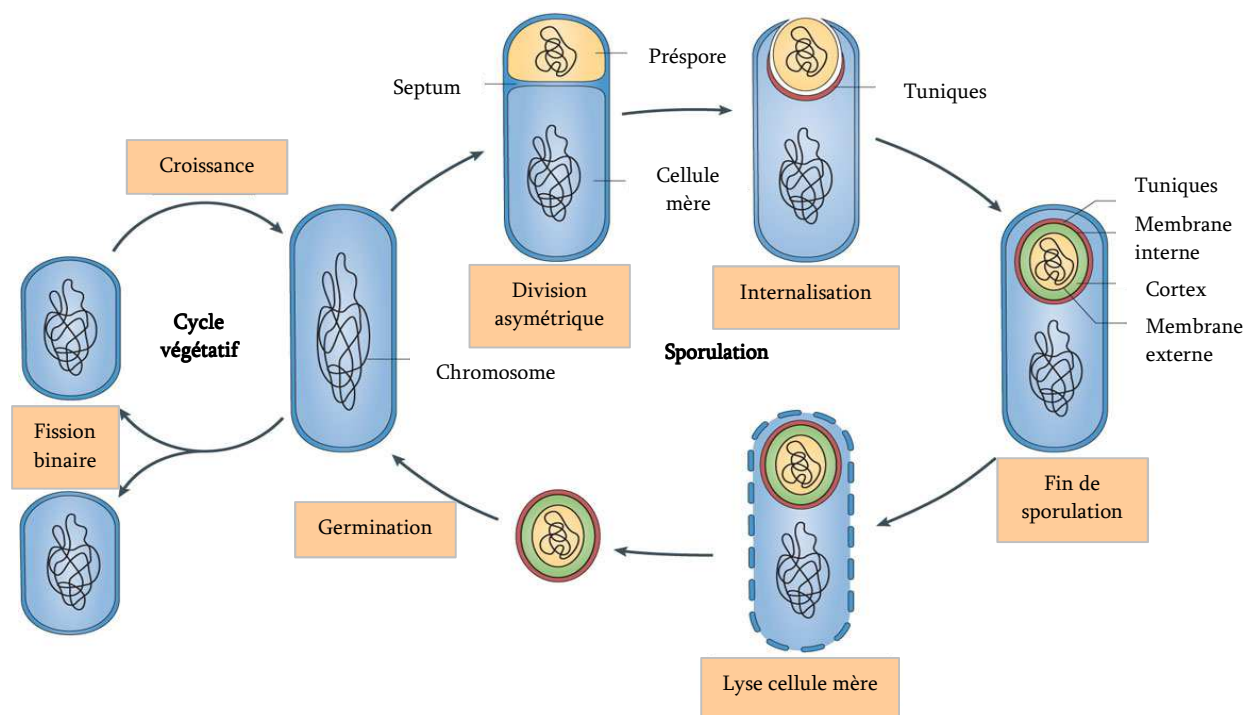
#### 2.1.1 Généralités

Les spores de bactéries ont été étudiées pour la première fois par Cohn et Koch en 1876 (Gould, 2006). Elles font partie des formes les plus résistantes des organismes vivants (Carlin, 2011). La formation des spores permet à la bactérie de survivre et résister à différents stress environnementaux tels que la chaleur, la dessiccation, les UV et les radiations, la digestion enzymatique ou encore les produits chimiques (Nicholson *et al.*, 2002; Setlow, 2006). De plus, les spores peuvent survivre pendant de très longues périodes dans des environnements pauvres en nutriments. En effet, plusieurs auteurs ont rapporté que les spores du groupe *Bacillus* pouvaient survivre plusieurs millions d'années dans des niches écologiques spécifiques (Cano and Borucki, 1995; Vreeland *et al.*, 2000). En raison de la persistance des spores et de l'ubiquité des microorganismes formant des spores, les spores sont des contaminants fréquents de denrées alimentaires (Vreeland *et al.*, 2000; de Clerck *et al.*, 2004a; de Clerck *et al.*, 2004b; Scott *et al.*, 2007). Les mécanismes de sporulation, germination et résistance sont beaucoup étudiés chez *Bacillus* avec comme modèle *B. subtilis*. En revanche, ces mécanismes le sont moins chez les bactéries anaérobies comme *Clostridium* et quasiment pas chez les thermophiles. Des auteurs ont cependant mis en évidence des différences dans les signaux de sporulation entre les *Bacilli* et les *Clostridia* avec notamment l'absence de quatre gènes impliqués dans la sporulation chez les *Clostridia* et une batterie de gènes codant les protéines de la tunique des spore retrouvées uniquement dans la famille des *Bacillaceae* (Galperin *et al.*, 2012).

#### 2.1.2 Sporulation et germination

La formation de spores est l'un des modes d'adaptation ultime des micro-organismes en réponse aux rigueurs de l'environnement. Ce processus est déclenché chez les bactéries pouvant former des spores par la diminution voire l'absence de nutriments ou bien par les stress subis par la cellule végétative dans l'environnement dans lequel elle se trouve (Burkholder and Grossman, 2000). La sporulation bactérienne est un processus complexe divisé en sept grandes étapes (Figure 6).

Le premier stade se caractérise par la présence d'un filament axial de matériel nucléaire qui s'étend sur toute la longueur de la cellule et qui correspond au génome dupliqué. Dans la deuxième étape, les deux génomes se séparent par fragmentation du filament axial, en même temps que la membrane cytoplasmique s'invagine près d'un pôle de la cellule pour former un septum. Ce septum partage la cellule en deux compartiments de taille inégale. Le septum de sporulation va envelopper le cytoplasme du petit compartiment pour former une préspore caractéristique du stade trois. Le grand compartiment correspond à la cellule mère. A cette étape, le processus de la sporulation est irréversible et les stades suivants correspondent à la maturation de la spore à l'intérieur de la cellule mère.



**Figure 6 : Cycle de sporulation et germination de *B. subtilis* (McKenney et al., 2013).**

La sporulation se traduit d'abord par la division asymétrique du sporange en deux compartiments : la cellule mère et la préspore, séparées par le septum. L'internalisation de la préspore par la cellule mère est suivie de la fission membranaire située au pôle opposé du sporange. Une double membrane liée à la préspore est formée. L'assemblage des couches de la spore commence aussitôt après l'initiation de l'internalisation et se poursuit jusqu'à la fin de la sporulation. Le cortex, peptidoglycane entre les membranes interne et externe de la préspore, est formé à la fin de la sporulation. Dans la dernière étape, la cellule mère est lysée pour libérer les spores matures dans l'environnement. Les spores sont capables de germer rapidement et de reprendre une croissance végétative en réponse à un apport en nutriments dans le milieu.

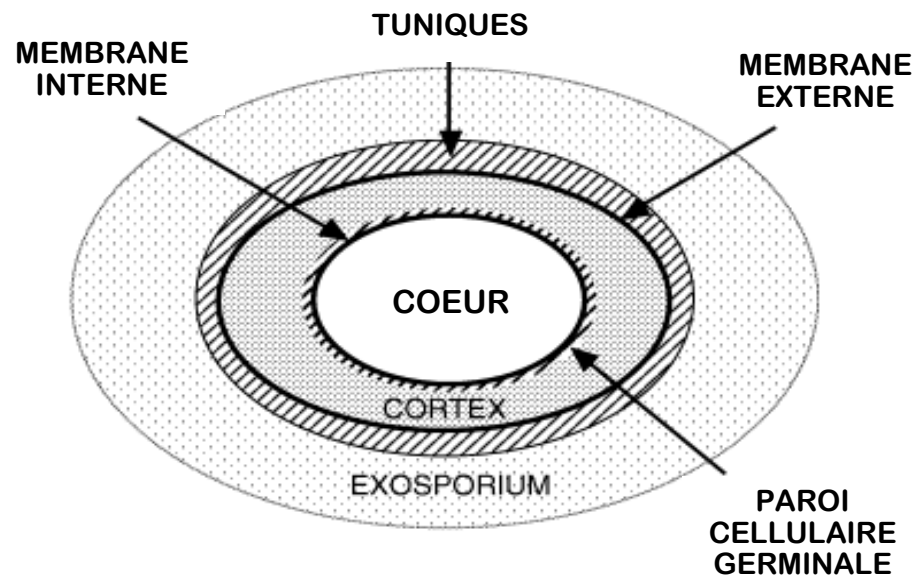
Au stade quatre, la cellule mère produit des molécules chimiquement proches du peptidoglycane qui viennent s'accumuler entre les deux membranes pour former le cortex. Chez certaines espèces, une autre couche protéique plus externe est synthétisée, c'est l'exosporium. La formation du cortex et de l'exosporium se poursuit au stade 5. On observe également une accumulation d'acide dipicolinique (DPA) et de calcium dans le cytoplasme. Cette accumulation s'accompagne d'une déshydratation de la spore, et de la production de SASPs (Small Acide Soluble spore Proteins). Au stade six, la maturation de la spore s'achève par la synthèse de nouvelles enveloppes protéiques : les tuniques, composées de protéines riches en cystéines, s'insèrent entre le cortex et l'exosporium. La cellule mère (ou sporange) est lysée au stade sept sous l'effet d'enzymes lytiques. La spore mature est libérée dans l'environnement. Le processus de sporulation dure généralement 7 à 10 heures. Ce mécanisme de différenciation cellulaire fait intervenir de nombreux gènes qui sont soumis aux facteurs transcriptionnels  $\sigma_K$  dans la cellule mère et  $\sigma_G$  dans la préspore (Sauer *et al.*, 1995; Stragier and Losick, 1996).

Trois stades sont impliqués dans le processus de germination : l'activation, l'initiation et l'émergence. Placée dans des conditions favorables à la croissance bactérienne (eau, nutriments, température, pH), la spore va donner naissance à une nouvelle cellule végétative. Cependant, malgré les conditions optimales de croissance, les spores doivent bien souvent être activées avant de débiter leur cycle de germination. Ainsi, le chauffage, la présence de nutriments tels que les acides aminés, les sucres et les nucléosides ou une diminution du pH du milieu à 2-3 peut activer la spore (Paidhungat *et al.*, 2001; Iciek *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2009). L'initiation débute dans des conditions favorables d'hydratation et en présence de métabolites effecteurs (alanine, adénosine, magnésium) qui pénètrent à travers les enveloppes endommagées et déclenchent un processus autolytique (Setlow, 2003). Des enzymes hydrolytiques dégradent de nombreux constituants de la spore et notamment le cortex qui libère le dipicolinate de calcium. Après l'élimination de la barrière corticale, la spore s'imbibe d'eau, se gonfle et perd ses propriétés de résistance. A ce stade, le processus de la germination est irréversible. L'émergence d'une nouvelle cellule végétative comprenant le cytoplasme sporal entouré de la membrane et de la paroi est possible grâce à la dégradation des enveloppes. La nouvelle cellule entre dans une phase active de biosynthèse et la croissance reprend graduellement.

La sporulation permet la survie de la bactérie grâce à ses propriétés uniques et aux différentes couches qui la composent lui permettant ainsi de résister aux différents stress environnementaux.

### 2.1.3 Propriétés et structure des spores

La structure de la spore et sa composition chimique jouent un rôle important dans la résistance des spores. Elles sont très différentes de celles de la cellule végétative en pleine croissance, avec des caractéristiques et des constituants uniques à la spore (Figure 7).



**Figure 7 : Structure d'une spore (Setlow, 2006)**

La spore est constituée d'un cœur central enveloppé d'une membrane interne et de la paroi cellulaire germinale. La couche suivante est le cortex puis des tuniques qui sont séparés par une membrane externe. Pour certaines espèces, la spore est aussi composée de l'exosporium.

Les différentes couches représentées ne sont pas dessinées à l'échelle. La taille des différentes couches en particulier l'exosporium, varie significativement entre les spores d'espèces différentes.

La survie des spores pendant de longues périodes est liée à l'acquisition de multiples mécanismes pour protéger les macromolécules. Ces mécanismes protègent également les spores des dommages causés par les stress environnementaux.

La survie des spores est associée à une faible activité métabolique marquée par de faibles quantités de cofacteurs métaboliques tel que l'ATP et le NADH (Gould, 2006). Aucun composé issu de métabolisme endogène ou exogène, ni même d'activité enzymatique dans les tuniques, ne sont présents dans la spore (Setlow, 1983; Setlow, 1994). En raison de la faible activité des enzymes, la spore ne peut pas réparer les dommages causés sur des macromolécules telles que l'ADN ou les protéines. Les processus de réparation se produisent

lorsque la spore retourne à l'état de cellule végétative lors de la germination. Si les dommages accumulés sont trop nombreux, ils entraînent la mort de la cellule germée (Setlow, 1995; Setlow and Setlow, 1996; Setlow, 2007).

La structure de la spore est souvent décrite comme un empilement de couches. La spore est constituée en son centre d'un cœur, aussi appelé noyau, contenant le matériel génétique, entouré par la membrane corticale (composé de la membrane interne et de la paroi de la cellule germinale) et du cortex qui est lui-même entouré de la membrane externe puis des tuniques. L'exosporium est la couche la plus éloignée du noyau en contact avec l'environnement.

L'exosporium est une large structure retrouvée chez la plupart des espèces, en particulier celles du groupe *Bacillus* (Lai *et al.*, 2003; Redmond *et al.*, 2004; Waller *et al.*, 2004), bien que non présente (ou de très petite taille) chez *B. subtilis* (Setlow, 2006). Il est composé de protéines y compris de plusieurs glycoprotéines trouvées uniquement dans les spores qui contiennent un exosporium (Lai *et al.*, 2003; Todd *et al.*, 2003; Redmond *et al.*, 2004). La fonction de ces protéines et de l'exosporium reste encore mal connue. Cependant, certains auteurs ont mis en évidence que cette structure complexe jouait un rôle dans l'attachement, la germination et la capacité à échapper aux défenses du système immunitaire (Redmond *et al.*, 2004; Baillie *et al.*, 2005; Steichen *et al.*, 2005; Bozue *et al.*, 2007; Faille *et al.*, 2010) ainsi que dans la capacité à se fixer à différents types de supports, en particulier de sols (Williams *et al.*, 2013a).

Les tuniques de la spore forment une structure complexe sous-jacente à l'exosporium composée de plusieurs couches contenant plus de 70 protéines (Kim *et al.*, 2006), dont la plupart sont codées par des gènes spécifiquement exprimés dans la spore chez *B. subtilis* (Driks, 1999; Lai *et al.*, 2003). La fonction de la plupart des protéines constituant les tuniques n'est pas encore clairement définie. Cependant, certaines d'entre elles sont impliquées dans l'assemblage global des tuniques de la spore ainsi que dans la formation de l'exosporium (Bailey-Smith *et al.*, 2005). Cette structure joue également un rôle dans la résistance de la spore face à de nombreux produits chimiques tels que les acides, les bases, les agents oxydants et les solvants organiques (Setlow, 2006), aux enzymes lytiques exogènes qui dégradent le cortex (Driks, 1999), aux radiations UV et aux peroxydes (Hullo *et al.*, 2001) ainsi que contre la prédation par les protozoaires (Klobutcher *et al.*, 2006).

La fonction précise de la membrane externe, qui se trouve sous les tuniques de la spore n'est pas connue. Cette membrane est une structure essentielle lors de la formation de la spore.

Le cortex est composé de peptidoglycane dont la structure est similaire à celui des cellules végétatives mais avec plusieurs modifications spécifiques à la spore. Ces modifications apparaissent cruciales dans la reconnaissance et la dégradation des couches du cortex lorsque la spore entre en germination. De plus, le cortex est essentiel lors de la formation de la spore et pour la diminution de la teneur en eau contenue dans le noyau de la spore même si le mécanisme mis en œuvre reste mal compris. Le cortex est dégradé pendant la germination permettant ainsi l'expansion du noyau de la spore (Setlow, 2003). Une seconde couche de peptidoglycane est présente sous le cortex, appelée paroi cellulaire germinale, dont la structure est identique à celle du peptidoglycane de la cellule végétative. Elle ne joue probablement pas de rôle dans la résistance des spores mais devient la paroi cellulaire de la spore quand elle germe (Setlow, 2003).

La membrane interne est composée de lipides et de protéines dont la majorité est impliquée dans le processus de sporulation et de germination de la spore (Korza and Setlow, 2012). Contrairement à la membrane externe, elle est une barrière imperméable du fait de la compression et du caractère statique des lipides (Cowan *et al.*, 2004; Setlow, 2006). Elle joue un rôle majeur dans la résistance de la spore contre les variations de température (Griffiths and Setlow, 2009) contre les agents chimiques, et plus particulièrement contre ceux qui traversent cette membrane pour endommager l'ADN (Nicholson *et al.*, 2002).

Enfin, la dernière couche de la spore est le cœur, qui est l'analogue du protoplaste de la cellule en pleine croissance. Le cœur contient la plupart des enzymes de la spore ainsi que l'ADN, les ribosomes et les ARNt. Généralement, les enzymes de la spore et l'ADN sont identiques à ceux de la cellule végétative mais certaines autres molécules sont retrouvées uniquement dans le cœur de la spore (Setlow, 1983; Setlow, 1994). Des petites molécules sont présentes dans le cœur et jouent un rôle dans la résistance de la spore. La première de ces petites molécules est l'eau. Elle représente 75-80% du poids humide du protoplaste dans une cellule végétative en croissance alors qu'elle n'est de seulement 27-55% du poids humide du cœur de la spore, en fonction des espèces (Gerhardt and Marquis, 1989). La faible teneur en eau du cœur joue un rôle important dans la résistance de la spore à la chaleur (Moeller *et al.*, 2009). La deuxième molécule retrouvée en grande quantité dans le cœur est l'acide pyridine-2,6-dicarboxylique (acide dipicolinique (DPA)). Cette molécule est synthétisée uniquement lors de la sporulation à l'intérieur de la cellule mère puis est incorporée dans la préspore à un stade plus avancé de la sporulation. Elle est présente exclusivement dans le cœur de la spore, chélatée avec des cations divalents dans un ratio 1:1 et plus spécifiquement avec le  $\text{Ca}^{2+}$  (Setlow, 2006). La quantité de DPA dans le cœur de la spore joue un rôle crucial dans la



réduction de la teneur en eau mais favorise également le maintien de la spore en dormance (Moeller *et al.*, 2009). Un troisième type de molécules est décrit dans le cœur de la spore. Il s'agit de petites protéines acides solubles appelées SASP de type- $\alpha/\beta$ . Elles sont synthétisées seulement pendant le développement de la préspore et représentent environ 10% des protéines totales de la spore (Slieman and Nicholson, 2001). Le DPA ainsi que les SASP de type-  $\alpha/\beta$  sont impliqués dans la résistance de la spore contre la chaleur et les traitements chimiques mais sont principalement impliqués dans la protection de l'ADN contre les radiations UV (Driks, 1999; Slieman and Nicholson, 2001; Setlow, 2006).

Ainsi, chaque couche constituant la spore participe par ses fonctions à la résistance et à la survie. La résistance thermique des spores est de loin celle qui est la plus modélisée, afin de pouvoir caractériser, établir et optimiser les traitements thermiques de préservation des aliments.

#### 2.1.4 Thermorésistance

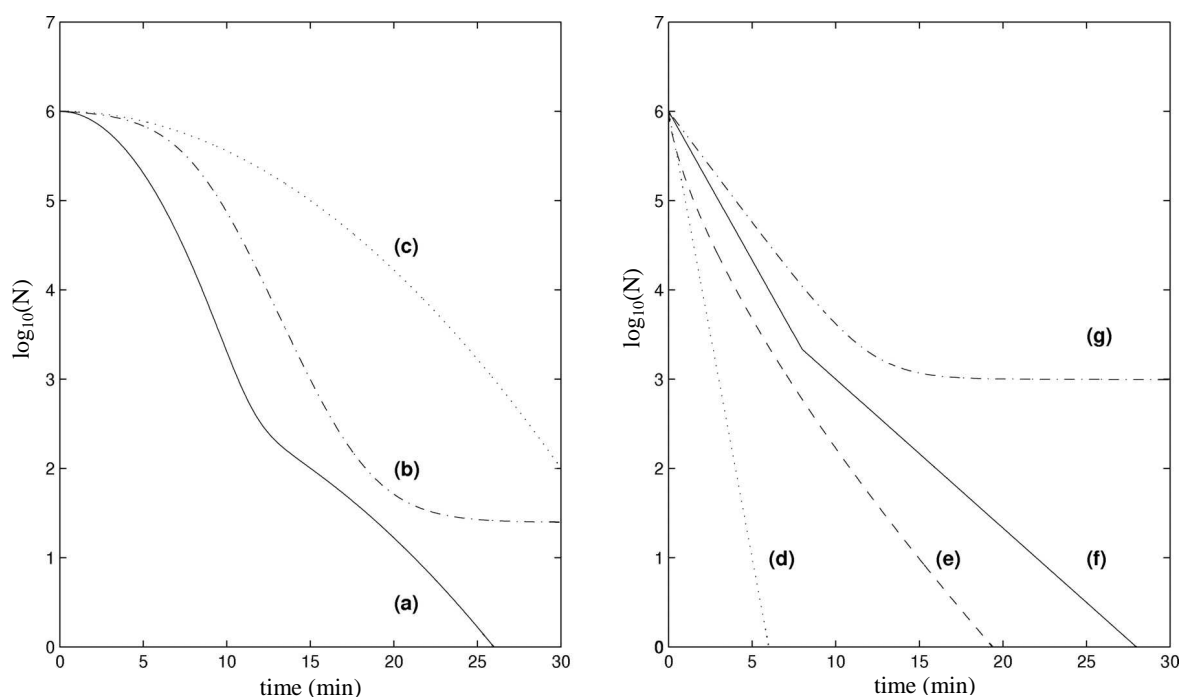
La destruction thermique des spores en fonction de la durée de traitement à une température donnée peut être modélisée. Le modèle déterministe qui définit la durée de réduction décimale, symbolisée D, est l'un des plus courants. Cette durée correspond au temps nécessaire (en minutes) pour réduire la population d'un facteur 10, à une température donnée (Katzin *et al.*, 1943). La cinétique de destruction des microorganismes est, dans la grande majorité des cas, décrite par l'équation suivante (1) basée sur une cinétique de l'ordre 1:

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D} \quad (1)$$

avec t le temps de traitement,  $N_0$  la population initiale, N la population survivante au temps t et D la durée de réduction décimale.

Un autre paramètre, appelé paramètre de thermorésistance ou facteur d'activation thermique et noté z, correspond à la variation de la température de traitement qui conduit à la modification d'un facteur 10 la durée de réduction décimale D (Bigelow, 1921). Ce paramètre couplé au facteur D permet de quantifier et modéliser la thermorésistance des souches bactériennes pour des conditions de température et de durée de traitement choisies. Ce système d'équation cinétique est très largement utilisé dans le domaine de la microbiologie

industrielle et sert de référence au traitement thermique. Cependant, ce modèle mathématique a des limites. La diminution de population microbienne au cours du temps est souvent considérée comme log-linéaire, mais ne l'est pas toujours. Une destruction log-linéaire en fonction du temps implique que toute la population bactérienne d'un échantillon présente la même thermorésistance. Or, dans de nombreux cas, des courbes de destruction thermique non linéaires sont rencontrées (Figure 8). Dans ce cas, le système de modélisation log-linéaire ne parvient pas à s'ajuster aux courbes expérimentales et les paramètres D et z ne sont plus adaptées.



**Figure 8 : Exemple de courbes de réduction obtenues lors d'un traitement thermique**

Les différents types de courbes d'inactivation fréquemment observées: biphasique avec diminution non linéaire (a), sigmoïdale (b), concave (c), linéaire (d), convexe (e), biphasique (f), linéaire avec effet de traîne (g) (Coroller *et al.*, 2006)

Un grand nombre de modèles non linéaires est disponible pour ajuster les courbes de destruction présentant différentes allures : un épaulement initial, un effet de traîne, une allure sigmoïde (avec épaulement et traîne), une convexité ou concavité, une allure biphasique par exemple (Mafart *et al.*, 2010). Ces modèles peuvent décrire chacune des allures précédemment citées via l'utilisation d'équations permettant une modélisation généralement satisfaisante de cinétique d'inactivation d'allures différentes (Geeraerd *et al.*, 2000; Geeraerd *et al.*, 2005). Parmi ces modèles, celui de Mafart prend en compte la diversité de distribution

au sein de la population bactérienne, inspirée de la distribution statistique de Weibull (Mafart *et al.*, 2002). Ce modèle simplifié peut s'adapter à des courbes concaves ou convexes (équation 2).

$$\log N = \log N_0 - \left(\frac{t}{\delta}\right)^p \quad (2)$$

avec N la population survivante après un traitement thermique de temps t, N<sub>0</sub> la population initiale, δ la durée de première réduction décimale, et p un paramètre de distribution de la courbe log(N) = f(t) décrivant une courbe concave (p>1), convexe (p<1) ou linéaire (p=1).

Ce modèle présente de nombreux avantages du fait de sa simplicité et de sa flexibilité pour définir des régressions non linéaires.

**Table 2 : Niveaux de thermorésistance de spores bactériennes**

| Type d'aliments et microorganismes        | D value (min) à :     |                      | Z value (°C)         |
|---|-----------------------|----------------------|----------------------|
|   | 121°C                 | 100°C                |                      |
| <b>Aliments peu acides (pH&gt;4.6)</b>    |                       |                      |                      |
| <u>Anaérobie thermophiles</u>             |                       |                      |                      |
| <i>Moorella thermoacetica</i>             | 30-38 <sup>a</sup>    |                      | 6.5-8.6 <sup>a</sup> |
| <u>Aérobie thermophiles</u>               |                       |                      |                      |
| <i>Geobacillus stearothermophilus</i>     | 4.0-4.5 <sup>b</sup>  | 3000 <sup>b</sup>    | 7 <sup>b</sup>       |
| <u>Anaérobie mésophiles</u>               |                       |                      |                      |
| <i>Clostridium sporogenes</i>             | 0.1-1.5 <sup>b</sup>  |                      | 9-13 <sup>b</sup>    |
| <i>Clostridium botulinum types A et B</i> | 0.1-0.2 <sup>b</sup>  | 50 <sup>b</sup>      | 10 <sup>b</sup>      |
| <i>Clostridium perfringens</i>            |                       | 0.3-20 <sup>b</sup>  | 10-30 <sup>b</sup>   |
| <u>Aérobie mésophile</u>                  |                       |                      |                      |
| <i>Bacillus licheniformis</i>             |                       | 13 <sup>b</sup>      | 6 <sup>b</sup>       |
| <i>Bacillus subtilis</i>                  |                       | 11 <sup>b</sup>      | 7 <sup>b</sup>       |
| <i>Bacillus cereus</i>                    |                       | 5 <sup>b</sup>       | 10 <sup>b</sup>      |
| <i>Bacillus megaterium</i>                |                       | 1 <sup>b</sup>       | 9 <sup>b</sup>       |
| <b>Aliments acides (pH&lt;4.6)</b>        |                       |                      |                      |
| <u>Aérobie thermotolérants</u>            |                       |                      |                      |
| <i>Bacillus coagulans</i>                 | 0.01-0.1 <sup>b</sup> |                      |                      |
| <u>Aérobie mésophiles</u>                 |                       |                      |                      |
| <i>Bacillus polymyxa</i>                  |                       | 0.1-0.5 <sup>b</sup> |                      |

<sup>a</sup>(André *et al.*, 2013) <sup>b</sup>(Farkas, 2007)

Bien que de nombreux travaux définissent différents paramètres pour évaluer l'efficacité des traitements thermiques, le modèle log-linéaire est le plus largement utilisé de par la signification pratique de ses paramètres mathématiques  $D$  et  $z$ . Ces deux valeurs permettent de dresser une hiérarchie dans la résistance thermique des spores de différentes espèces. La table 2 est un exemple de valeurs de  $D$  et  $z$  rencontrées dans la littérature.

Divers facteurs comme les conditions de température, le pH du milieu pendant la sporulation, la composition du milieu environnant pendant ou après traitement, les caractéristiques du traitement et l'espèce microbienne peuvent fortement influencer la thermorésistance des microorganismes.

Les conditions de sporulation, tels que la composition du milieu, la température, le pH et l' $a_w$ , influencent significativement la thermorésistance des microorganismes (Condon *et al.*, 1992; Penna *et al.*, 2003; Planchon *et al.*, 2010; Baril *et al.*, 2011). Des spores de *Bacillus* obtenues sur un milieu supplémenté d'un mélange d'ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Mn}^{2+}$ ) ont montré une thermorésistance plus élevée que les spores produites sur un milieu contenant uniquement des ions manganèse  $\text{Mn}^{2+}$  (Cazemier *et al.*, 2001). Selon l'organisme, le pH initial du milieu de sporulation peut avoir un effet positif ou négatif sur la thermorésistance. Les spores de *B. cereus* ATCC 4342 ont montré une résistance plus faible lorsque le pH de sporulation était de 5,5 par rapport à un milieu neutre. En revanche, la souche *B. cereus* ATCC 7004 n'a montré aucune différence de thermorésistance en fonction du pH de sporulation (Mazas *et al.*, 1997). Pour *Bacillus subtilis*, les conditions optimales de sporulation ne correspondent pas aux conditions pour obtenir la thermorésistance la plus élevée. Par exemple, les spores produites dans un milieu à pH 10 sont en faible quantité mais leur thermorésistance est plus élevée que celles de spores obtenues dans un milieu favorable à la sporulation (Nguyen Thi Minh *et al.*, 2011). Le cœur des spores produites à une température plus élevée que leur optimum de croissance présente une plus faible teneur en eau et les spores produites ont une plus forte thermorésistance (Condon *et al.*, 1992; Cortezzo and Setlow, 2005; Setlow, 2006; Planchon *et al.*, 2010). Des spores de *Bacillus cereus* produites à 48°C ont montrées une résistance beaucoup plus importante à un traitement thermique que celles produites à 22°C (Melly *et al.*, 2002). Cette caractéristique est corrélée à l'hydratation du cœur s'élevant à 39% dans les spores obtenues à 22°C, contre 34,25% dans celles obtenues à 48°C. Similairement, Minh *et al.* (2011) ont montré une meilleure résistance à la chaleur des spores de *B. subtilis* produites à 45°C plutôt qu'à 22°C.

Bien que le pH soit le facteur le plus connu pour son effet sur la germination et la croissance post-traitement, et le plus exploité, les conditions environnementales de la spore

pendant le traitement et après le traitement ont fait l'objet de plusieurs études. Un pH bas du milieu lors du traitement va provoquer une résistance thermique plus faible de spores de *B. coagulans*, comparé à un pH voisin de 7 (Palop *et al.*, 1999). Une faible  $a_w$  (0,90) lors du traitement provoquera une augmentation de la résistance à la chaleur (Kaur *et al.*, 1998; Coroller *et al.*, 2001). De manière générale, la thermorésistance des microorganismes, y compris sous forme végétative, est plus élevée lorsque le milieu est riche en matières grasses (Kaur *et al.*, 1998; Leguerinel *et al.*, 2005). Enfin, l'addition de calcium (0,25mM) dans le milieu de recouvrement a entraîné une plus forte reprise de croissance des spores de *G. stearothermophilus* après un choc thermique à 100°C pendant 15 min (Sasaki *et al.*, 2000).

De nombreuses espèces bactériennes ont la capacité de former des spores thermorésistantes. Parmi ces espèces, un grand nombre sont retrouvées dans les produits alimentaires et leur développement peuvent entraîner une altération du produit avant sa date limite de consommation.

## 2.2 Espèces bactériennes principalement responsable des non-stabilités

Les problèmes de non-stabilité (gonflement, acidification...) des conserves alimentaires sont principalement causés par la résistance des spores bactériennes au traitement thermique, les cas de contamination post-traitement par manque d'étanchéité de l'emballage étant moins fréquents. Nous ne détaillerons ici que les cas de non-stabilité détectés à 55°C. Les bactéries thermophiles sont reconnues comme la cause majeure des non-stabilités des conserves (Ashton and Bernard, 1992; Denny and Corlett, 1992; Olson and Sorrells, 1992; Prevost *et al.*, 2010; André *et al.*, 2013). Les deux bactéries anaérobies *Moorella thermoacetica* et *Thermoanaerobacterium* spp et l'aérobie *G. stearothermophilus* représentent à eux seuls plus de 75% des cas de non-stabilité à 55°C (Dotzauer *et al.*, 2002; Carlier and Bedora-Faure, 2006; Carlier *et al.*, 2006; André *et al.*, 2013). Les autres espèces bactériennes souvent rencontrées sont *B. coagulans*, *B. smithii* et *B. licheniformis*. D'autres bactéries ont aussi été retrouvées telles que *Caldanaerobius* spp., *Gelria glutamica*, *Anoxybacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Thermoanaerobacter* spp., *Clostridium thermopalmarium/thermobutyricum*, *Thermoactinomyces* sp. ainsi que plusieurs autres espèces de *Geobacillus* sp, mais leur prévalence reste très faible (André *et al.*, 2013).

*Geobacillus stearothermophilus* et *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* sont respectivement responsables de plus de 35% et 36% des cas de non-stabilité des conserves

peu acides (Ashton and Bernard, 1992; André *et al.*, 2013). *Moorella thermoacetica* est une bactérie anaérobie stricte formant des spores hautement thermorésistantes (Byrer *et al.*, 2000; Wagner and Wiegel, 2008). Dans les aliments, elle a été essentiellement détectée dans les conserves. Son développement y entraîne une forte acidification avec une production de gaz provoquant le « bombage » de l'emballage (Ashton and Bernard, 1992; Olson and Sorrells, 1992; Carlier and Bedora-Faure, 2006). *Thermoanaerobacterium* spp. a été identifié dans 8% des échantillons de non-stabilité de conserves (n=460) (André *et al.*, 2013). Cette espèce partage les mêmes caractéristiques physiologiques que *M. thermoacetica* telles que la croissance en anaérobiose et une température optimale de croissance située autour de 63°C. *G. stearothermophilus* est décrite comme responsable du « flat sour » ou surissement sans bombage (Kalogridou-Vassiliadou, 1992; Olson and Sorrells, 1992; Moir *et al.*, 2001; Tucker and Featherstone, 2011). L'altération correspond à une fermentation des saccharides du produit alimentaire sans production de gaz. Elle est retrouvée dans les produits appertisés tels que les conserves de légumes, les plats cuisinés ou encore des plats à base de foie gras de canard (André *et al.*, 2013). Mais elle est également souvent retrouvée dans les poudres de lait (Ronimus *et al.*, 2003; Rückert *et al.*, 2004; Burgess *et al.*, 2013), dans des extraits de gélatine (de Clerck *et al.*, 2004a), des ingrédients déshydratés (Postollec *et al.*, 2012) ou encore au cours de la fermentation du cacao traditionnel (Schwan *et al.*, 1986).

*B. coagulans* est connue pour être une espèce modérément acidophile et thermotolérante avec un métabolisme de croissance aéroanaérobie facultatif (de Clerck *et al.*, 2004b). Ses caractéristiques phénotypiques lui permettent de se développer dans des aliments légèrement acides (>4,2). Elle est souvent impliquée dans la détérioration des conserves : produits à base de tomate (Moir *et al.*, 2001; Tucker and Featherstone, 2011), de légumes (Oomes *et al.*, 2007) et également dans d'autres produits tels que le lait en poudre (Ronimus *et al.*, 2003; Rückert *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2007), les produits fermentés, les ingrédients déshydratés (Postollec *et al.*, 2012) et l'extrait de gélatine (de Clerck *et al.*, 2004a). La détérioration du produit est principalement due à la production d'acide lactique à une forte concentration. *B. licheniformis* est une espèce aéro-anaérobie facultative thermotolérante qui a été souvent retrouvée dans les conserves alimentaires altérées (Carlier and Bedora-Faure, 2006; Postollec *et al.*, 2012) et les produits à base de lait (Rückert *et al.*, 2004; Scott *et al.*, 2007; Coorevits *et al.*, 2008; Postollec *et al.*, 2012) mais également dans d'autres produits destinés à la consommation alimentaire (Schwan *et al.*, 1986; de Clerck *et al.*, 2004a; Lurlina *et al.*, 2006). Enfin, *B. smithii* est une espèce aéro-anaérobie facultative capable de se développer jusqu'à 65°C. Elle a été retrouvée dans des conserves alimentaires de légumes, de plats cuisinés et de

plats contenant du foie gras de canard (André *et al.*, 2013) ainsi que dans des ingrédients déshydratés (Postollec *et al.*, 2012).

En somme, si la diversité des espèces responsables des altérations des conserves est large, *M. thermoacetica/thermoautotrophica* et *G. stearothermophilus* sont beaucoup plus fréquentes que les autres. Malgré cela, sans doute du fait de leur caractère non pathogène, peu d'études ont été menées sur ces deux espèces. Mieux connaître leurs caractéristiques de croissance et la variabilité intra-espèce dégagerait des pistes pour mieux maîtriser les contaminations par les spores avant traitement thermique des conserves.

### 2.2.1 *Geobacillus stearothermophilus*

Pendant de nombreuses années, *Bacillus stearothermophilus* (Donk, 1920) était la seule espèce obligatoirement thermophile du genre *Bacillus*. Après 1980, d'autres espèces thermophiles ont été proposées sur la base d'analyses phénotypiques, puis l'application ultérieure du séquençage du gène de la sous unité 16S de l'ARN ribosomal. Des membres du genre *Bacillus* tels que *B. stearothermophilus*, *B. kaustophilus* et *B. thermoglucosidasius* formaient une lignée génétique, appelée groupe 5, qui était distincte de *Bacillus sensu stricto* (Ash *et al.*, 1991). En 2001, après la découverte de deux nouvelles espèces aérobies thermophiles formant des spores dans les réservoirs de pétrole, Nazina *et al.* proposèrent que les espèces du groupe 5 déterminées par Ash *et al.* soient attribuées à un nouveau genre appelé *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001). Ce nouveau genre contenait huit espèces dont *Geobacillus stearothermophilus* qui est toujours l'espèce type du genre. La description la plus récente de cette espèce, fournie par Coorevits *et al.*, est basée sur celle proposée par Nazina *et al.* (Nazina *et al.*, 2001; Coorevits *et al.*, 2012).

#### • *Caractéristiques de croissance*

*G. stearothermophilus* est une bactérie aérobique, formant des spores, thermophile à Gram variable. Elle a été isolée pour la première fois à partir de maïs et de haricot vert en conserve (Donk, 1920). *G. stearothermophilus* est capable de se développer dans une gamme de température allant de 30°C à 70°C avec un optimum de croissance compris entre 40°C et 60°C (Coorevits *et al.*, 2012). A des températures supérieures à 70°C, la membrane de *G. stearothermophilus* perd sa capacité à maintenir le potentiel membranaire du potassium. De même, en dessous de 45°C et au-dessus de 70°C, la synthèse d'une protéine responsable de

l'absorption des acides aminés et des vitamines est inhibée (Wu and Welker, 1991). Des pH compris entre 6 et 9 permettent sa croissance. Un milieu dont la salinité dépasse 5% ne permet pas la croissance de *G. stearothermophilus* (Coorevits *et al.*, 2012).

Quelques études ont été menées sur la détermination des conditions optimales de croissance, de sporulation et de germination de *G. stearothermophilus*. La dernière publication traitant ce sujet date de 2003 et les auteurs se sont intéressés aux effets du milieu sur le rendement en spores et la thermorésistance de *G. stearothermophilus* (Penna *et al.*, 2003).

Le glucose, le fructose, le sucrose, le glycérol et l'amidon permettent la croissance de *G. stearothermophilus* tandis que d'autres substrats carbonés tels que le citrate, l'alpha-cétoglutarate, le succinate, le fumarate, le malate, l'acétate et le lactate ne permettent pas sa croissance (Rowe *et al.*, 1975). La concentration du glucose doit être comprise entre 0,1% et 0,4% avec un minimum de 0,05% pour permettre une bonne croissance. Des études sur l'effet du manganèse ( $MnCl_2$ ) montrent que de fortes concentrations (9,5 g/L) favorisent la croissance (Rowe *et al.*, 1975) tandis que de faibles concentrations (0,06g/l) n'ont pas d'influence sur la croissance végétative de *G. stearothermophilus* (Thompson and Thames, 1967). Les milieux de croissance riche en extraits de levures ou peptones permettent d'obtenir une quantité importante de cellules (Penna *et al.*, 2003).

### • *La sporulation*

La sporulation chez *G. stearothermophilus* est déclenchée par une carence nutritionnelle ou un stress environnemental comme pour les espèces du genre *Bacillus* (Burkholder and Grossman, 2000). Son processus est identique à celui des autres *Bacillus* et se produit en phase stationnaire de croissance (Foster, 1994). Des concentrations de glucose supérieures à 0,5% inhibent la sporulation de *G. stearothermophilus* (Penna *et al.*, 1998).

La quantité de cellules végétatives peut influencer le taux de sporulation (Penna *et al.*, 1998). Une croissance élevée est donc un pré-requis pour obtenir un bon rendement en spores.

Les suspensions de spores peuvent être générées à partir de milieux de sporulation composés d'éléments chimiques connus contenant du magnésium, du manganèse, du fer, du calcium, du sodium, du potassium ainsi que du glucose en faible concentration et une concentration relativement élevée d'acide L-glutamique (Penna *et al.*, 1998). Thompson et Thames (1967) avaient noté antérieurement que l'addition de manganèse dans le milieu de



culture entraînait la sporulation. D'après Penna *et al* (1998), le rendement de la sporulation est principalement dépendant du facteur associé au chlorure de sodium.

Les composés minéraux tels que les phosphates de potassium et d'ammonium, le manganèse ( $MnSO_4$ ) et le calcium ( $CaCl_2$ ) améliorent fortement la sporulation chez les *Bacilli* (Dlugokenski *et al.*, 2011). La présence de ces minéraux, notamment du calcium, entraîne une augmentation de la thermorésistance des spores.

#### • *La thermorésistance*

Les spores du genre *Bacillus* peuvent être extrêmement résistantes à la chaleur, aux radiations et aux agents chimiques (Cortezzo and Setlow, 2005; Setlow, 2006). Plus particulièrement, les spores de *G. stearothermophilus* résistent aux traitements par micro-ondes, à la vapeur et aux agents chimiques comme le formaldéhyde et le peroxyde d'hydrogène (Latimer and Matsen, 1977; Wright *et al.*, 1995; Unger-Bimczok *et al.*, 2008). Leur grande résistance à la chaleur humide leur a valu d'être couramment utilisées comme indicateurs biologiques pour contrôler le processus de stérilisation à la vapeur humide (FDA, 2007; USP, 2008).

La thermorésistance des spores de *G. stearothermophilus* évaluée avec un  $D_{120^\circ C}$  était comprise entre 1 et 5 minutes (Bender and Marquis, 1985; Ocio *et al.*, 1996; Farkas, 2007; André *et al.*, 2013). L'influence de nombreux facteurs sur la thermorésistance a été évaluée sur les spores de *G. stearothermophilus*. Les conditions de sporulation liées à la composition du milieu en nutriments et en ions, au pH et à la salinité influencent significativement la thermorésistance des microorganismes. Le pH est le facteur le plus étudié (Rodrigo *et al.*, 1999; Penna *et al.*, 2000; Iciek *et al.*, 2006; Guizelini *et al.*, 2012). Un milieu de sporulation acide va entraîner une diminution de la thermorésistance alors qu'un pH élevé la favorise. Il a été montré que la thermorésistance des spores de *G. stearothermophilus* variait selon le type d'acide utilisé dans le milieu (Fernandez *et al.*, 1995). Par exemple, la valeur de D à  $121^\circ C$  est de 3,1 min dans un milieu sans acide, de 1,7 min avec de l'acide citrique et de 2 min en présence de glucono delta lactone (GDL). Guizelini *et al* (2012) ont mis en évidence qu'une concentration faible en nutriments, tels que l'extrait de levure et de peptone, dans le milieu de sporulation augmentait la résistance des spores à la chaleur. Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par Penna *et al* (2000) mais peuvent être expliqués par la composition et la concentration des autres éléments formant le milieu de sporulation (Guizelini *et al.*, 2012). Tout comme les nutriments, des concentrations faibles en chlorure de sodium et en potassium

dans le milieu de sporulation augmentent la thermorésistance des spores de *G. stearothermophilus* (Penna *et al.*, 2000). En revanche l'utilisation des ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  n'affecte pas la thermorésistance des spores quelle que soit la concentration utilisée mais sont nécessaires à l'état de trace pour la sporulation.

Les valeurs de D sont aussi affectées par la composition du milieu de traitement (Ocio *et al.*, 1996). Après une étape de traitement à 80°C pendant 10 minutes, un pH bas et la présence de chlorure de sodium dans le milieu de traitement entraîne une destruction plus rapide des spores (Iciek *et al.*, 2006) Des auteurs ont montré que la variation du pH du milieu de traitement de 7,0 à 4,0 entraînait une diminution de la thermorésistance de 23 fois la valeur initiale (Lopez *et al.*, 1996). Enfin, la valeur de D diminue lorsque les spores sont incubées après le traitement thermique en anaérobiose par rapport à une incubation en aérobiose (Periago *et al.*, 1998). Récemment, les résultats d'une méta-analyse ont permis d'établir un modèle de variation de la thermorésistance de *G. stearothermophilus* en fonction de la température et du pH (Rigaux *et al.*, 2013).

### 2.2.2 *Moorella thermoacetica*

*M. thermoacetica* est une bactérie anaérobie stricte, formant des spores, thermophile à Gram positif. Elle est capable de se développer de façon chimiolitho-autotrophe ou hétérotrophe c'est-à-dire qu'elle peut utiliser le carbone provenant de molécules organiques (hétérotrophe) ou le carbone atmosphérique issu du  $CO_2$  (autotrophe) (Daniel *et al.*, 1990). Cette espèce est isolée d'écosystèmes dont la température est élevée tels que les puits de pétrole, les sources thermales, les boues volcaniques, les fumiers et également dans les conserveries (Carlier and Bedora-Faure, 2006; André *et al.*, 2013). Anciennement décrite comme *Clostridium thermoaceticum*, elle a été séparée du groupe des Clostridies en 1994 sur l'analyse de la séquence du gène codant l'ARNr 16S (Collins *et al.*, 1994). Cependant, cette séquence n'est pas suffisamment discriminante pour séparer les deux espèces *M. thermoacetica* et *M. thermoautotrophica*. En 2008, le génome de la souche de référence ATCC 39073 a été séquencé et mis en ligne dans les bases de données (Pierce *et al.*, 2008). L'espèce *M. thermoacetica* présente un intérêt industriel du fait de sa production élevée d'acétate pendant sa phase de croissance par la voie de l'acétyl-coA référée sous le nom de voie de Wood-Ljungdahl. C'est pourquoi un grand nombre d'étude s'est focalisé sur la régulation de la production et l'optimisation du rendement en acide acétique (Bock *et al.*, 1997; Cheryan *et al.*, 1997; Talabardon *et al.*, 2000)

### • *Caractéristiques de croissance*

*M. thermoacetica* est capable de se développer à des températures situées entre 45°C et 65°C avec un optimum de croissance entre 55°C et 60°C (Fontaine *et al.*, 1942). Le pH du milieu doit être compris entre 5,7 et 7,7 avec un optimum à 6,8 (Ljungdahl, 1986; Byrer *et al.*, 2000). *M. thermocetica* est une bactérie strictement anaérobie. Malgré cela, de faibles concentrations en oxygène (<1.5 %) n'altèrent pas son activité métabolique, notamment sa synthèse d'acide acétique mais peuvent entraîner une phase de latence jusqu'à 12h (Karnholz *et al.*, 2002; Das *et al.*, 2005). Contrairement à *G. stearothermophilus*, *M. thermoacetica* nécessite des composés spécifiques dans son milieu de croissance. Elle peut utiliser différentes sources de carbone comme le fructose, le glucose et le xylose lorsqu'elle se développe de manière hétérotrophe (Andreesen *et al.*, 1973; Carlier and Bedora-Faure, 2006). Cependant, elle ne synthétise pas de précurseur de NAD et NADP et par conséquent le milieu doit contenir de l'acide nicotinique (Lundie and Drake, 1984). Le milieu de culture doit également contenir des éléments métalliques à l'état de traces ainsi que des vitamines (Andreesen *et al.*, 1973; Koesnandar *et al.*, 1991). La croissance des bactéries anaérobies strictes, comme *M. thermoacetica*, est également favorisée par la présence de composés réducteurs dans le milieu tels que la cystéine et le glycolate (Seifritz *et al.*, 1999). *Moorella thermoacetica* est toutefois connue pour être difficilement cultivable dans les milieux de laboratoire en raison des conditions drastiques nécessaires pour sa croissance (reporté par André *et al.*, 2013).

### • *La sporulation*

La sporulation chez *M. thermoacetica* est généralement obtenue dans des milieux riches comme pour les espèces du genre *Clostridium*. D'après la littérature, des taux de sporulation élevés (entre 10<sup>6</sup> à 10<sup>8</sup> spores/ml) ont été obtenus pour *M. thermoacetica* sur les milieux de Sanaka et Byrer (Byrer *et al.*, 2000). Dans le milieu de Byrer, contenant des éléments minéraux et des vitamines, la concentration en spores diffère en fonction du mode de croissance de la bactérie. En effet, une croissance chimioorgano-hétérotrophe permet d'obtenir un meilleur rendement en spores qu'une croissance chimioolitho-autotrophe à la température optimale de 60 °C (Byrer *et al.*, 2000). Ces deux milieux n'ont pas permis d'obtenir de sporulation au CTCPA pour des isolats sauvages de *M. thermoacetica*. Le milieu bi-phasique à base d'extrait de viande et semi-liquide (Cooked meat), généralement utilisé

pour la sporulation des clostridies, n'a pas non plus permis d'obtenir de spores de *M. thermoacetica* au laboratoire du CTCPA (résultats internes au CTCPA).

#### • *Thermorésistance*

Les spores de *M. thermoacetica* sont les plus thermorésistantes rencontrées parmi les contaminants de produits alimentaires. Bryer *et al* (2000) ont trouvé des valeurs de D à 121°C comprises entre 83 et 111 min sur des spores produites à 60°C. Ces valeurs très élevées sont vraisemblablement dues à la présence d'un cortex très épais, couche majoritairement impliquée dans la déshydratation de la spore (Byrer *et al.*, 2000; Moeller *et al.*, 2009). Ces auteurs ont montré que la température ainsi que le mode de sporulation influençaient fortement la thermorésistance. En effet, les bactéries placées à 25°C pendant leur phase exponentielle de croissance étaient moins thermorésistantes avec des valeurs de D à 121°C comprises entre 23 et 43 minutes selon les souches. De même, une croissance chimioorgano-hétérotrophe permet d'obtenir des spores jusqu'à trois fois plus résistante à la chaleur contrairement à une croissance chimiolitho-autotrophe (Byrer *et al.*, 2000).

*G. stearothermophilus* et *M. thermoacetica/thermoautotrophica* sont les principales espèces responsables d'altérations des conserves de légumes à 55°C. Cette prévalence élevée dans le produit fini est principalement due à la thermorésistance de leur spore. D'autres bactéries formant des spores sont présentes dans les usines et contaminent les lignes de production et ce quelque soit le type d'aliment utilisé.

### **2.3 L'écologie microbienne des bactéries formant des spores sur les lignes de production**

Les bactéries formant des spores présentent une prévalence naturelle élevée dans les aliments. Elles sont omniprésentes dans l'environnement et présentent une importante diversité. Elles ont la capacité de former des spores qui peuvent résister à des conditions extrêmes de hautes pressions hydrostatiques, de températures élevées ou basses, aux biocides et aux radiations UV (Nicholson *et al.*, 2000; Moeller *et al.*, 2009). Elles sont généralement retrouvées dans le sol. La bactérie formant des spores *C. botulinum* forme la toxine la plus puissante dans l'alimentation humaine et a été détectée dans les échantillons de sol de toute

origine géographique (Dodds, 1993). La concentration dans le sol des spores de *Bacillus* ou de *Clostridium* sp. est voisine de  $10^6$  spore/g (Lund, 1986; Hong *et al.*, 2009), ce qui en fait une source directe de contamination potentielle des produits végétaux. La diversité des spores dans les matières premières a également été largement étudiée pour le lait cru. Dans la filière laitière, l'environnement de la ferme tel que l'ensilage et le sol sont des sources majeures de contaminations. Les bactéries formant des spores ont été retrouvés à des concentrations de  $10^4$  UFC/mL au niveau des ensilages (Giffel *et al.*, 2002; Scheldeman *et al.*, 2005; Coorevits *et al.*, 2008). Les principales espèces retrouvées sont *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus* et *B. cereus* (Giffel *et al.*, 2002). Sevenier *et al.*, (2012) ont trouvé des concentrations en spores de bactéries thermophiles comprises entre  $10^3$  et  $10^5$  UFC/g sur des carottes et haricots fraîchement récoltés. La prévalence de spores hautement thermorésistantes comprenant *M. thermocetica*, *G. stearotherophilus* et *Thermoanaerobacterium* spp. atteignait 19,5% des échantillons prélevés (Sevenier *et al.*, 2012).

Les spores bactériennes sont parmi les formes les plus résistantes des organismes vivant. Leur résistance favorise leur survie dans les processus de transformation des aliments entraînant leur persistance à long terme dans les aliments. Par exemple, les procédés de traitement thermique modéré comme la pasteurisation du lait ou le blanchiment des légumes influencent l'écologie bactérienne. Les espèces principalement retrouvées dans le lait UHT et le lait pasteurisé sont les espèces du genre *Bacillus* tels que *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*, *Brevibacillus* and *Paenibacillus* (Giffel *et al.*, 2002; Scheldeman *et al.*, 2005). Les espèces du genre *Bacillus* sont par ailleurs largement retrouvées dans plusieurs autres produits alimentaires transformés tels que les épices, les légumes transformées, le riz, les céréales, le miel et le surimi (Snowdon and Cliver, 1996; Coton *et al.*, 2011; André *et al.*, 2013). Les concentrations de spores dans certains ingrédients comme les épices, les poudres de lait ou les farines peuvent être très élevées avec des concentrations dépassant  $10^3$  spores/g (Farkas, 2000; Rückert *et al.*, 2004; Oomes *et al.*, 2007). Les aliments transformés comme les plats cuisinés sont une combinaison de plusieurs ingrédients : chacun apporte ses propres bactéries sporulées dans les produits alimentaires finis.

Le développement bactérien, après la germination des spores dans les aliments peut se produire dans une large gamme de température, pH et activité de l'eau. En effet, les bactéries formant des spores présentent des caractéristiques phénotypiques et génotypiques très variées avec des souches pouvant avoir une croissance aérobie, aéro-anaérobie facultative ou anaérobie stricte et être psychrophiles, mésophiles ou thermophiles (Postollec *et al.*, 2012). Leur croissance dans les aliments peut causer l'altération des produits et des intoxications

alimentaires parfois sévères. La contamination des aliments par les bactéries formant des spores est par conséquent très étudiée. Deux exemples illustrent l'intérêt de l'utilisation d'outils de biologie moléculaire pour comprendre la contamination des aliments et des lignes de production par les bactéries formant des spores. L'application de la M13-PCR à des isolats de *B. cereus* obtenus à partir d'échantillons prélevés sur une ligne de production de purée de courgette a montré la proximité génétique entre les bactéries isolées des courgettes au stade de la récolte et celles isolées de produits finis (Guinebretiere *et al.*, 2003; Guinebretiere and Nguyen-The, 2003). D'autres auteurs ont étudié la contamination de concentré de poire par *Alicyclobacillus acidoterrestris* et *Alicyclobacillus acidocaldarius*, deux bactéries acidophiles formant des spores. Des souches présentant des profils génétiques identiques ont été identifiées à la fois dans le sol situé à l'extérieur de l'usine et dans le concentré de poire (Groenewald *et al.*, 2009; McKnight *et al.*, 2010). Ainsi, il est démontré que la contamination des produits transformés provient en partie des matières premières végétales, elles-mêmes contaminées via les sols. Dans la filière laitière, le typage moléculaire de *B. sporothermodurans* isolé de lait UHT (ultra haute température) et de lait stérilisé de plusieurs pays et continents a permis de mettre en évidence des liens génétiques étroits entre les souches isolées des produits finis (Guillaume-Gentil *et al.*, 2002). La diversité des bactéries présentes dans les poudres de lait ont fait l'objet de récentes études. Trois espèces majoritaires ont été révélées par typage moléculaire : *G. stearothermophilus*, *A. flavithermus* et *B. licheniformis* (Ronimus *et al.*, 2003; Rückert *et al.*, 2004).

L'utilisation d'outils de biologie moléculaire s'est avérée très utile pour identifier et caractériser les bactéries formant des spores présentes dans les aliments et sur les lignes de production.

### **3. Les outils de biologie moléculaire pour l'étude de la diversité**

#### **3.1 Généralités**

L'étude de la diversité bactérienne peut être réalisée selon deux systèmes de typage : le phénotypage et le génotypage.

Le phénotype des bactéries est déterminé sur plusieurs critères tels que la morphologie des colonies sur un milieu de culture choisi, des tests biochimiques, la capacité à produire des toxines, la sérologie, les conditions de croissance ( $T^{\circ}$ , pH,  $a_w$ ) et la résistance aux antibiotiques (Feig and Stersky, 1981; Baumann *et al.*, 1984; Fegan *et al.*, 1995). Cependant,

ces méthodes ne permettent pas une discrimination suffisante des souches ou groupes de souches à l'intérieur d'une même espèce. Au cours de ces vingt dernières années, les méthodes de biologie moléculaire ont progressivement remplacé les méthodes phénotypiques (Li *et al.*, 2009) qui sont devenues un outil complémentaire pour l'étude de la diversité bactérienne (Carlier and Bedora-Faure, 2006; Carlin *et al.*, 2006; Adiguzel *et al.*, 2009). Le typage des bactéries nécessite l'élaboration d'empreintes génétiques des bactéries au niveau intra-espèce. Cette diversité intra-espèce est le résultat d'évènements génétiques qui se sont produits dans le génome des bactéries au cours du temps. Ces méthodes moléculaires nécessitent toutes l'utilisation de l'ADN bactérien, principalement sous forme d'un chromosome unique dont la taille varie entre 1,5 et 13 millions de paires de bases selon l'espèce.

Un grand nombre de méthodes de typage moléculaire est disponible pour l'étude du génome. Le choix de la technique de typage est primordial et doit être adaptée en fonction des besoins de l'étude. Différents paramètres d'évaluation de la méthode sont utilisés.

- la spécificité : propriété d'une méthode d'analyse de convenir exclusivement à la caractéristique ou à l'analyte, avec la garantie que le résultat de l'analyse ne provient que de l'analyte,
- la typabilité : capacité à obtenir un résultat positif pour chaque souche étudiée,
- la répétabilité : conditions où les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode sur des individus identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur, utilisant le même équipement et dans un court intervalle de temps,
- la reproductibilité : conditions où les résultats d'essai sont obtenus par la même méthode sur des individus identiques dans différents laboratoires, avec différents opérateurs et/ou utilisant des équipements différents.

La faisabilité de l'approche qui sera retenue repose sur plusieurs critères : la capacité à appliquer la technique à un grand nombre d'échantillons, l'accessibilité à la technique, et enfin le coût du matériel et des réactifs nécessaires.

Actuellement, les méthodes de génotypage bactérien sont classées en trois catégories principales. La première regroupe les techniques qui sont basées sur l'analyse des profils électrophorétiques d'ADN. Cela permet de classifier les bactéries en utilisant la présence et la taille des fragments obtenus par amplification et/ou digestion enzymatique de l'ADN génomique. La seconde catégorie repose sur le séquençage de l'ADN par l'étude du polymorphisme des séquences. Enfin la troisième catégorie traite les méthodes basées sur l'hybridation d'ADN.

## 3.2 Les méthodes basées sur l'analyse des profils de migration des fragments d'ADN

L'amplification d'ADN à l'aide de la PCR a plusieurs avantages tels que la sensibilité, la rapidité, la spécificité et la reproductibilité et elle est applicable à tout type d'échantillons (Li *et al.*, 2009). La restriction enzymatique est quant à elle un outil efficace et précis.

### 3.2.1 Électrophorèse sur Gel en Champ Pulsé (PFGE)

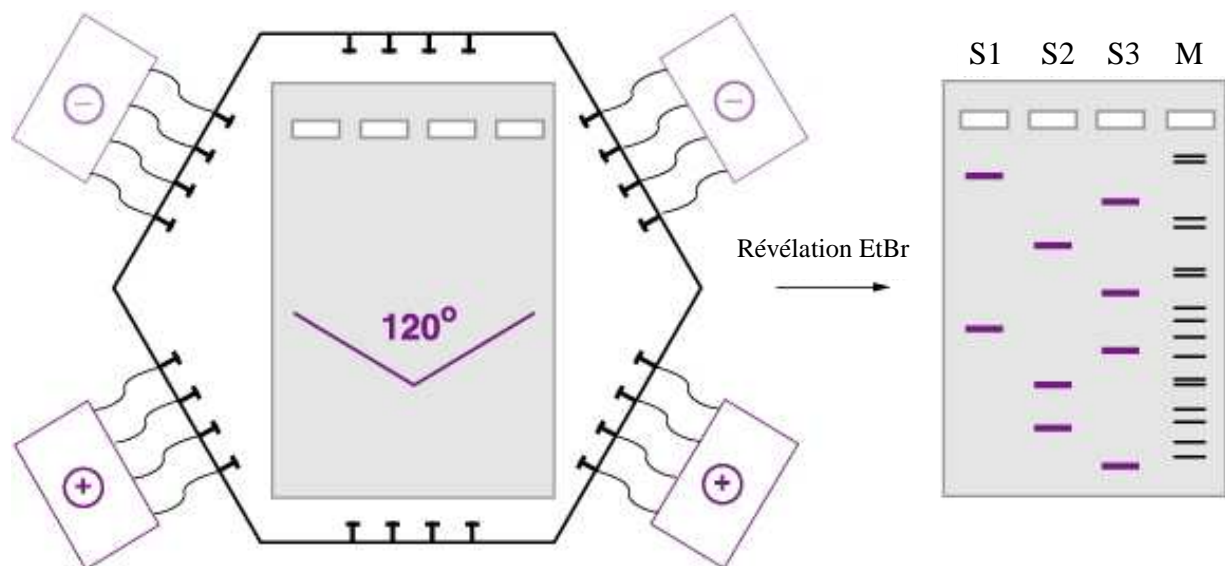
#### • Principe

L'électrophorèse sur gel en champ pulsé, encore appelée PFGE pour "Pulsed Field Gel Electrophoresis", a été développée afin de séparer les grandes molécules d'ADN (>50 kb), comme le sont les chromosomes microbiens (Schwartz and Cantor, 1984).

Dans un champ électrique conventionnel constant, l'électrophorèse en gel d'agarose ne permet pas de séparer les grandes molécules d'ADN même en diminuant au maximum la concentration d'agarose. En dessous de 0,4% d'agarose, les gels sont impossibles à manipuler. La porosité d'un gel d'agarose classique est inférieure au micron alors que la longueur d'une molécule d'ADN de 50 kb complètement étirée est de l'ordre de 18 µm. La vitesse de migration des molécules d'ADN dont la taille est supérieure à 20 kb n'est plus affectée par l'effet de filtration du gel d'agarose et reste constante quelle que soit la taille de la molécule. De ce fait, il est impossible de différencier les ADN bactériens supérieurs à 20 kb. L'électrophorèse en champ pulsé est le résultat de la combinaison d'une digestion par des enzymes de restriction à faible nombre de sites de coupure (Quelle and Catalano, 2001; Ribot *et al.*, 2001) et d'une migration électrophorétique qui consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps dans l'épaisseur du gel (Figure 9). Les changements de direction des molécules en fonction de leur structure tridimensionnelle durant la migration font varier leur distance totale de migration (Lai *et al.*, 1989). La PFGE permet ainsi de séparer des fragments d'ADN de très grande taille, jusqu'à 10 Mb (Schwartz and Cantor, 1984; Herschleb *et al.*, 2007). Pour ce type d'électrophorèse, l'extraction et la purification d'ADN ne s'effectue pas avec des techniques classiques. En effet, la grande taille des molécules d'ADN les rend fragiles et elles peuvent se casser pendant la manipulation. Pour éviter la cassure mécanique des molécules d'ADN, l'extraction est effectuée après incorporation des bactéries dans des blocs d'agarose. Dans cette gélose l'ADN est libéré



chimiquement puis digéré par une ou deux enzymes de restriction. Le choix des enzymes à utiliser est un des facteurs les plus critiques dans la réalisation des profils électrophorétiques du fait de la spécificité du site de clivage pour chaque enzyme. Elles doivent couper le génome en un nombre de fragments suffisamment grand pour être discriminant et suffisamment réduit pour que le profil soit exploitable. Lorsque le site de clivage possède une longueur élevée (huit nucléotides ou plus), la reconnaissance du motif survenant rarement fournit une plus haute résolution en PFGE (Chen *et al.*, 2005). Le résultat, obtenu en 24 à 48 heures après révélation de l'ADN, est un profil de macro-restriction définissant un pulsotype. L'interprétation repose sur le nombre et la taille des fragments.



**Figure 9 : Electrophorèse sur gel en champs pulsé (PFGE) (Miesfield R.L, 2000)**

Le gel d'agarose est placé dans une cuve électrophorétique avec des générateurs de pôle (+) et (-) placés de part et d'autre de la cuve. L'orientation du champ électrique est alternée de façon à faire migrer les gros fragments ADN. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium (EtBr) qui va révéler les profils de bande des souches étudiées (S1, S2, S3)

Comme proposé par Tenover *et al* (1995), les isolats bactériens montrant le même profil PFGE sont considérés comme appartenant au même groupe. Les isolats qui diffèrent par un simple événement génétique, qui se reflète par une différence de une à trois bandes, sont considérés comme étant "étroitement liés" et les isolats qui diffèrent par quatre à six bandes, susceptibles de représenter deux événements génétiques, sont considérés comme étant

“possiblement” liés. Les isolats bactériens contenant six bandes différentes ou plus sont considérés comme non liés (Tenover *et al.*, 1995).

#### • *Avantages et inconvénients*

L'intérêt majeur de cette méthode réside dans le fait qu'elle permet de prendre en compte l'ensemble du génome bactérien et présente un pouvoir discriminant potentiellement important. La PFGE fournit une haute résolution de l'analyse du génome conduisant à considérer cette technique comme “l'étalon d'or” du typage des bactéries (Tenover *et al.*, 1995). Cependant, bien que très largement utilisée, cette technique est longue puisqu'elle nécessite environ trois jours de manipulation pour obtenir le profil d'une dizaine de souches, sans répétition, et requiert une certaine expertise de la part du manipulateur ainsi qu'un appareillage coûteux. La mise au point de la méthode peut s'avérer également longue notamment avec les pré-essais réalisés avec les enzymes de restriction pour chaque espèce afin de déterminer la plus adaptée d'entre elles. Dans ce contexte, des recherches *in silico* de séquences de génome complet de bactéries se sont avérées très utiles pour détecter les sites de clivages des enzymes de restriction afin d'optimiser le pouvoir discriminant de la PFGE et réduire ses coûts d'utilisation (Lee *et al.*, 2006; Chou *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2013). Par ailleurs, un site web dédié à l'analyse *in silico* du résultat du clivage de génomes bactériens complets selon l'enzyme de restriction a été développé par Bikandi *et al.*, (Bikandi *et al.*, 2004). Compte tenu parfois de la faible reproductibilité inter laboratoires des résultats, la PFGE est plus souvent employée pour la comparaison de souches au sein d'un même laboratoire. Néanmoins, pour certaines bactéries, l'accumulation de pulsotypes a nécessité des efforts de standardisation de protocole et des critères pour le typage bactérien ainsi que le développement de bases de données en ligne pour la comparaison de profils de PFGE (Herschleb *et al.*, 2007).

#### • *Applications*

La PFGE est largement utilisée en épidémiologie (Felix *et al.*, 2013) et principalement pour l'identification des souches de *Escherichia coli* O157 responsable d'intoxication alimentaire grave pouvant causer la mort (Gerner-Smidt *et al.*, 2006b; Lanier *et al.*, 2009; Arthur *et al.*, 2013; Laidler *et al.*, 2013). La plus grande base de données, PulseNet ([www.cdc.gov/pulsenet/](http://www.cdc.gov/pulsenet/)), cible principalement cinq bactéries responsables d'infections

alimentaires à savoir *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* et *Campylobacter* (Gerner-Smidt *et al.*, 2006a; Gerner-Smidt *et al.*, 2006b; Hedberg and Besser, 2006; Ribot *et al.*, 2006; Pichel *et al.*, 2012). Du fait de son pouvoir discriminant important, elle est également employée en microbiologie et biologie évolutive pour déterminer les liens de parentés entre les souches telle qu'il a été démontré dans l'industrie alimentaire (Oliveira *et al.*, 2006; Dhaisne *et al.*, 2013).

### 3.2.2 Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

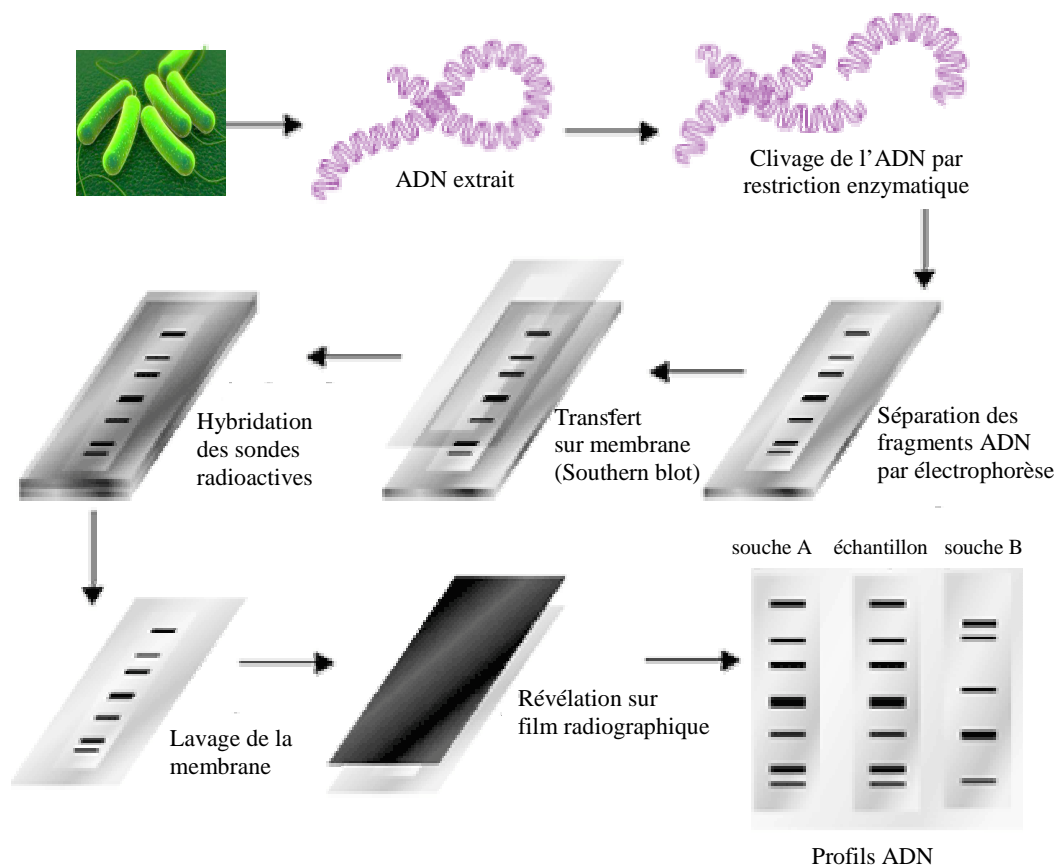
#### • Principe

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction ou « Restriction Fragment Length Polymorphism » est l'une des premières méthodes de typage moléculaire à avoir été largement utilisée pour détecter les variations de séquences de l'ADN. Cette méthode consiste à utiliser des enzymes de restriction à haute fréquence de coupure qui vont cliver l'ADN en un nombre très élevé de sites et générer ainsi de nombreux (plus de 100) fragments de taille variable. En fonction des individus, la quantité et la taille des fragments sont différents. Si deux souches diffèrent dans la distance entre deux sites de clivage pour une enzyme de restriction particulière, la longueur des fragments générés sera différente. Également, si l'ADN d'une souche porte la séquence d'un site en plus, par rapport à une autre souche, un fragment supplémentaire sera généré (Figure 10). Les profils sont obtenus après migration électrophorétique. Compte tenu du nombre élevé de fragments, les profils ne sont pas exploitables en l'état. Ainsi, la RFLP peut être combinée à une technique d'hybridation appelée « Southern Blot ». Des sondes ADN marquées spécifiques d'une séquence donnée vont s'hybrider sur les fragments obtenus après la digestion enzymatique puis les régions hybridées vont être révélées de façon à faciliter l'interprétation des résultats. Le profil électrophorétique des signaux d'hybridation liés à la sonde est alors utilisé comme empreinte génétique du groupe bactérien.

Le ribotypage est une variante de la RFLP qui implique l'utilisation d'une sonde ADN marquée codant l'ARN ribosomal. Les gènes codant les trois ARNs ribosomaux 16S, 23S et 5S des bactéries sont organisés en opéron (*rrn*) et séparés par des régions internes transcrites appelée ITS. La région ITS entre les gènes codant l'ARNr 16S et 23S peut être caractérisé par la présence de gènes ARNt spécifiques. La variabilité de la taille des régions ITS ainsi que le nombre de copies de gènes ARNt peut considérablement varier notamment entre les souches

d'une même espèce ce qui permet de définir des profils de bandes différents appelés ribotypes (Schumann and Pukall, 2013).

Enfin, la PCR-RFLP est une méthode basée sur l'analyse de fragments obtenus par RFLP d'un locus spécifique amplifié par PCR. Le nombre limité de fragments de restriction obtenu après la digestion enzymatique peut être visualisé directement sur un gel d'électrophorèse sans avoir besoin d'utiliser de sonde d'hybridation.



**Figure 10 : Les différentes étapes de la méthode de polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) (Moretti *et al.*, 2001)**

L'ADN extrait est clivé par une enzyme de restriction à haute fréquence de coupure. Les fragments sont séparés sur un gel d'agarose puis transféré sur une membrane. Des sondes radioactives spécifiques des séquences recherchées vont s'hybrider sur les fragments d'ADN contenus sur la membrane. Après des étapes de lavage, la révélation des sondes qui se sont hybridées est effectuée sur un film radiographique.

- ***Avantages et inconvénients***

La RFLP est une méthode peu coûteuse en réactifs et ne nécessite pas de matériel spécifique onéreux. Elle est très utilisée en microbiologie notamment pour l'analyse simultanée de plusieurs souches. La digestion enzymatique réalisée sur l'ensemble du génome offre un bon pouvoir discriminant pour cette méthode. Pour être reproductible, la digestion doit être appliquée sur de l'ADN de haute qualité. L'analyse RFLP nécessite une quantité d'ADN génomique élevée, en plus de sa haute qualité qui peut limiter son application lorsque l'ADN est difficile à obtenir. Cette méthode nécessite beaucoup de temps de manipulation et d'attente notamment lors de la digestion enzymatique bien que cette étape puisse être réalisée la nuit ou bien en utilisant des enzymes avec une activité enzymatique rapide (<15 minutes). Enfin, l'hybridation des sondes peut s'avérer longue et implique des systèmes de détection qui utilisent soit des isotopes radioactifs soit des réactifs biochimiques.

- ***Applications***

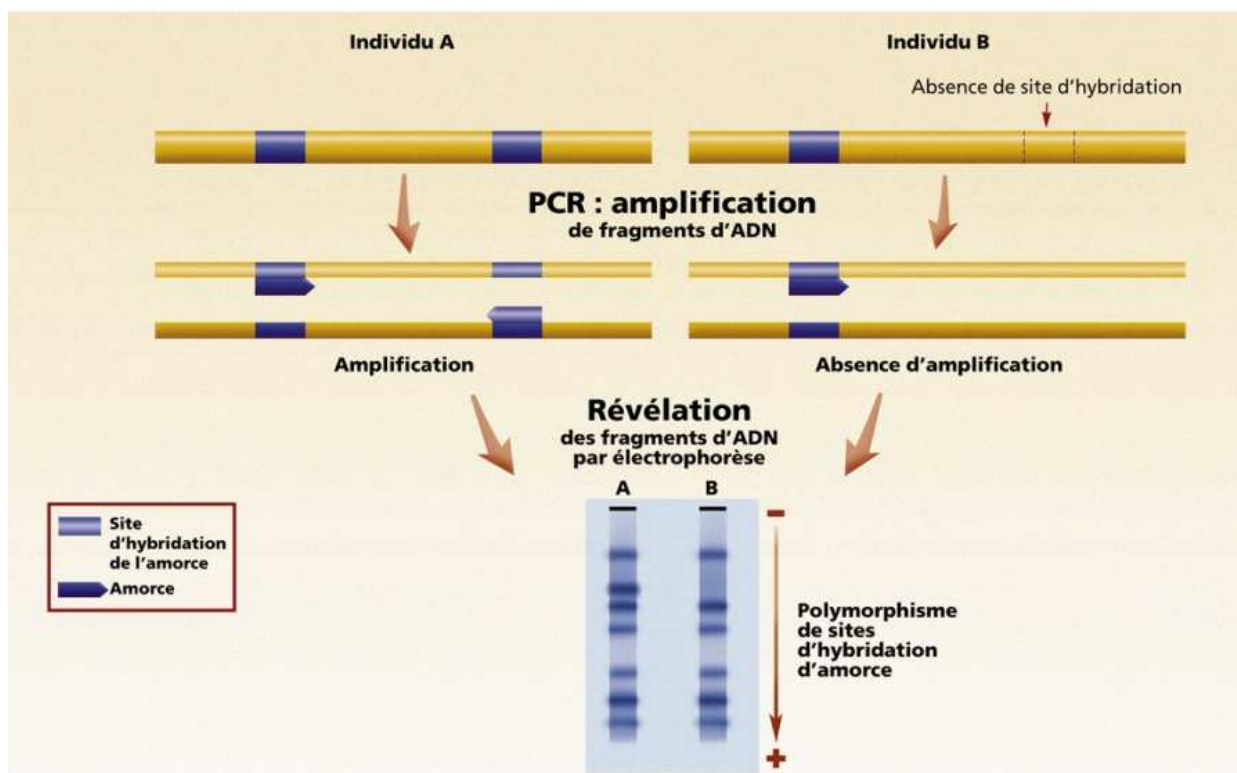
En 1980, Botstein *et al* ont publié une carte génétique du génome humain. Pour la première fois, ils ont utilisé des marqueurs génétiques issus de la technique de RFLP (Botstein *et al.*, 1980). L'analyse RFLP utilisant des sondes dérivées de l'élément d'insertion *IS6110* a été considéré comme la méthode « étalon d'or » du typage de *Mycobacterium tuberculosis* (Kanduma *et al.*, 2003). Ainsi, la plupart des articles scientifiques disponibles sur l'application de la RFLP sont focalisés sur le typage et l'épidémiologie de *Mycobacterium tuberculosis* (Roetzer *et al.*, 2012; de Beer *et al.*, 2013; Green *et al.*, 2013). D'autres études épidémiologiques ont été effectuées en utilisant la RFLP pour le typage de virus humain comme le papillomavirus (Gasperov *et al.*, 2008) et le cytomégalovirus (Madhavan and Priya, 2002) ainsi que le typage d'espèces bactériennes telles que *Staphylococcus aureus* (Mehndiratta *et al.*, 2009), *Lactobacillus delbrueckii* (Giraffa *et al.*, 2003) et *Bacillus* spp. (Shangkuan *et al.*, 2000).

### 3.2.3 Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)

- ***Principe***

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe, plus connue sous le nom de RAPD pour "Random Amplified Polymorphic DNA" a été décrite pour la première fois en 1990 par

Williams et simultanément par Welsh (Welsh and McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Il s'agit d'une réaction de PCR dans laquelle les fragments d'ADN sont amplifiés de façon aléatoire. Le principe est basé sur l'utilisation d'une amorce courte unique définie de façon arbitraire (9 à 15 pb) qui s'hybride avec l'ADN chromosomique à faible température d'hybridation et va permettre d'initier l'amplification d'un certain nombre de régions du génome (Figure 11). Cela suppose que deux amorces s'hybrident de part et d'autre d'un segment d'ADN d'une taille compatible avec l'amplification. L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose des fragments amplifiés donnera un profil particulier, caractéristique de l'ADN de départ. Plusieurs facteurs peuvent influencer la qualité du résultat par RAPD. Les principaux sont la séquence de l'amorce utilisée, qui va conditionner le nombre de cibles dans l'ADN génomique, la température d'hybridation et la teneur en magnésium, ajustées pour optimiser le niveau de spécificité, la pureté et la concentration des échantillons d'ADN, ainsi que l'équipement et les réactifs utilisés pour la PCR, qui peuvent introduire une variabilité conséquente sur les conditions réactionnelles et donc sur les amplicons obtenus.



**Figure 11: Principe de l'amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD) (www.gnis.org)**

L'amorce unique de petite taille s'hybride sur les régions complémentaires de l'ADN génomique. Lorsque deux amorces sont assez proches, l'amplification d'ADN par l'enzyme polymérase est possible et va générer un fragment ADN révélé sur un gel d'agarose par électrophorèse

Il est à noter que des variantes de la RAPD sont utilisées dont la M13-PCR. Cette méthode est basée sur l'hybridation de l'amorce M13 qui va cibler les séquences du phage du même nom qui s'est inséré de façon aléatoire dans le génome de certaines bactéries. Elle a été initialement utilisée pour le typage de lignées eucaryotes humaines et animales (Vassart *et al.*, 1987).

- ***Avantages et inconvénients***

Un intérêt de cette méthode est de pouvoir amplifier par PCR différentes portions du génome sans avoir à connaître sa séquence. Ainsi, elle permet d'étudier des systèmes biologiques pour lesquels peu d'information sont disponibles. Cette technique est discriminante car le nombre et la localisation des sites d'hybridation des amorces varient d'une souche à l'autre dans une même espèce. L'utilisation d'une séquence d'amorce courte permet statistiquement d'augmenter le nombre de sites d'hybridation par rapport à une amorce plus longue. D'autre part, les conditions réactionnelles sont ajustées de façon à permettre des hybridations dont la spécificité n'est pas stricte. La durée de mise en œuvre de cette méthode dépend du programme de l'amplification qui peut durer plusieurs heures (8h). Le principal inconvénient de la méthode est le manque de reproductibilité et la nécessité d'une standardisation poussée pour compenser cette lacune. Ainsi la RAPD doit être réalisée sur de l'ADN génomique complètement intègre pour obtenir des résultats reproductibles.

Les conditions de spécificité plus drastiques en M13-PCR qu'en RAPD permettent d'obtenir une meilleure reproductibilité des amplifications PCR (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003).

- ***Applications***

La RAPD a été très utilisée pour étudier la variabilité génétique de plusieurs espèces bactériennes, incluant d'importants pathogènes de l'Homme (Jin *et al.*, 2006; Nath *et al.*, 2010). Dans l'industrie alimentaire, la méthode a permis d'identifier les contaminants présents sur les lignes de fabrication (Eneroth *et al.*, 2000; Guinebretiere and Nguyen-The, 2003) mais également dans les produits finis tels que le lait pasteurisé (Eneroth *et al.*, 2001), les jus de fruits (McKnight *et al.*, 2010) ou encore dans la viande (Byun *et al.*, 2001). La M13-PCR est quant à elle une méthode actuellement largement utilisée pour le typage fongique et bactérien, et plus particulièrement dans le cadre d'études épidémiologiques pour

les bactéries pathogènes ou de dispersion géographique (Anderson *et al.*, 1996; Birch *et al.*, 1996 ; Arias *et al.*, 1998 ; Torriani *et al.*, 1999 ; Andrighetto *et al.*, 2000; Aznar and Alarcón, 2002 ; Guinebretiere and Nguyen-The, 2003 ; Cocolin *et al.*, 2005; Rossetti and Giraffa, 2005; Manzano *et al.*, 2009).

### 3.2.4 rep-PCR

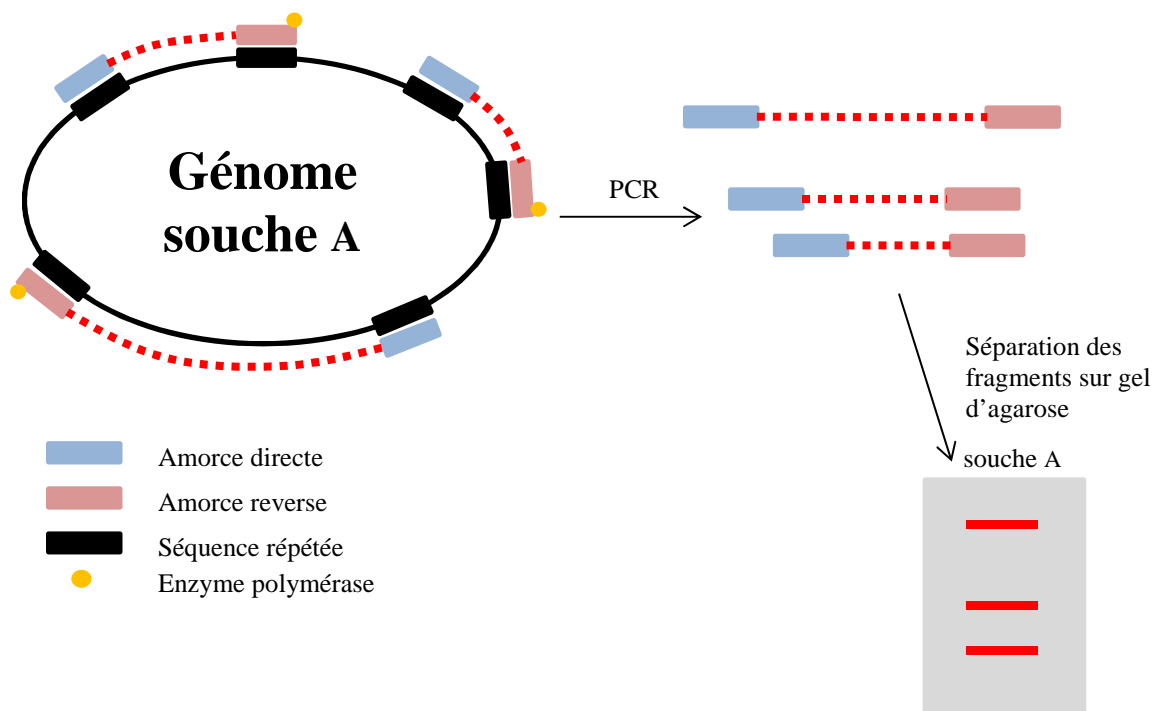
#### • *Principe*

La rep-PCR pour « Repetitive element sequence-based PCR » est une méthode de typage qui permet la différenciation des organismes en utilisant des amorces complémentaires de séquences ADN répétées d'origine naturelle dispersées en plusieurs copies au sein du génome bactérien (Gilson *et al.*, 1984; Stern *et al.*, 1984; Hulton *et al.*, 1991; Lupski and Weinstock, 1992; Koeuth *et al.*, 1995). La fonction de ces séquences d'ADN répétées n'a pas besoin d'être connue pour utiliser ces séquences afin de déterminer une empreinte génétique des bactéries (Brumlik *et al.*, 2001; Meintanis *et al.*, 2008; Adiguzel *et al.*, 2009). Les amorces complémentaires de ces séquences ADN répétées sont utilisées pour amplifier des régions d'ADN situées entre deux sites de fixation de l'amorce. Si la distance entre les deux amorces est suffisamment courte, la région intercalaire sera synthétisée au cours du cycle de la PCR. Chaque amplification compatible avec les conditions d'amplification va ainsi générer un fragment d'ADN. Des fragments de différentes tailles seront obtenus et ensuite séparés par électrophorèse en gel d'agarose. La détection des fragments amplifiés résulte en un profil de bandes qui correspond à l'empreinte génétique de la bactérie (Figure 12).

Malgré leur petite taille, les génomes bactériens possèdent une grande variété d'éléments de séquences répétées. La variabilité, la complexité et la spécificité taxonomique des répétitions des génomes microbiens sont similaires à celles trouvées chez les plantes et les animaux. Ces répétitions peuvent être dispersées dans le génome ou répétées en tandem au niveau d'un seul *locus*. Elles peuvent être de différents types :

- séquences REP ou « Repetitive Extragenic Palindromic elements » de 35-40 paires de bases (Gilson *et al.*, 1984; Stern *et al.*, 1984),
- ERIC « Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus » de 124-127 paires de bases (Hulton *et al.*, 1991; Lupski and Weinstock, 1992),
- BOX, découvertes chez *Streptococcus pneumoniae*, (Koeuth *et al.*, 1995),
- STAR pour « *Staphylococcus aureus* Repeats » (Cramton *et al.*, 2000)





**Figure 12 : Principe de la méthode rep-PCR**

Les amorces directe et reverse s'hybrident par complémentarité sur les séquences répétées. L'enzyme polymérase synthétise un fragment d'ADN compris entre les deux amorces lors de la PCR. Les produits d'amplifications sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. La révélation des fragments donne un profil de bandes correspondant à l'empreinte génétique de la bactérie.

• *Avantages et inconvénients*

Tout comme la RAPD, la rep-PCR ne cible pas des séquences spécifiques d'une espèce. Les amorces peuvent donc *a priori* être utilisées pour le typage de n'importe quelle espèce bactérienne. Cependant, contrairement à la RAPD, les amorces utilisées sont spécifiques d'une séquence à amplifier ce qui permet un gain en reproductibilité. Cette méthode est un outil de qualité pour le typage bactérien car elle ne nécessite pas d'appareillage coûteux, elle est facile à mettre en application et ne demande pas beaucoup de temps de manipulation. De plus, le protocole de la rep-PCR peut être réalisé directement à partir de la suspension bactérienne évitant ainsi l'étape d'extraction ADN (Woods *et al.*, 1993). Comme toutes les techniques basées sur les méthodes de PCR, il est indispensable de prendre les précautions nécessaire afin d'éviter les contaminations potentielles notamment en intégrant plusieurs témoins pour s'assurer de la qualité de la détection.

- **Applications**

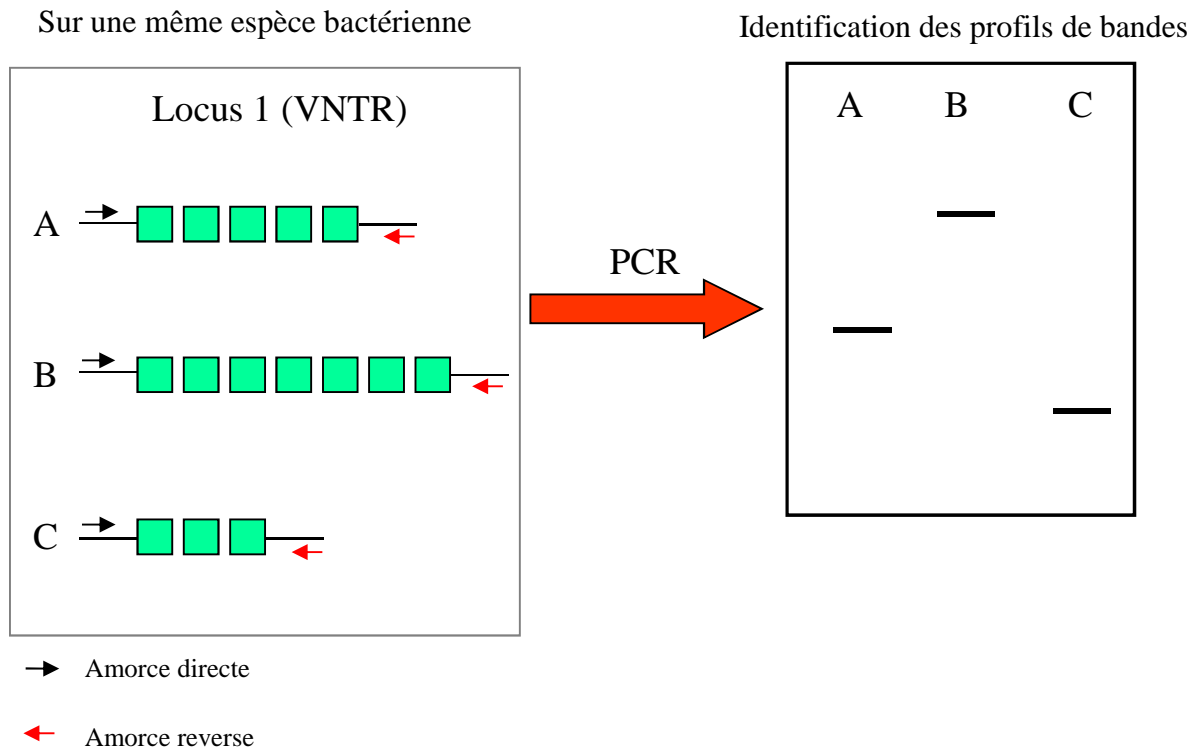
Du fait de sa facilité d'utilisation et de sa bonne reproductibilité, de nombreuses études ont appliqué la méthode de la rep-PCR basée sur divers types de séquences telles que les séquences REP, ERIC et BOX (Meintanis *et al.*, 2008; Adiguzel *et al.*, 2009; Inan *et al.*, 2011). Cette technique a été très largement appliquée ces dernières décennies pour l'étude épidémiologique moléculaire et le classement des microorganismes de l'environnement (Snelling *et al.*, 1996; Versalovic and Lupski, 1998; Sachdeva and Viridi, 2004; Mohapatra *et al.*, 2007; Rademaker *et al.*, 2008; Katara *et al.*, 2012). Cette méthode a également été utilisée pour l'étude de l'écologie et de l'évolution microbienne (Guinebretiere *et al.*, 2001; Manzano *et al.*, 2009). Du fait de sa forte sensibilité pour le génotypage bactérien au niveau de la souche, la rep-PCR est utilisée pour de nombreux genres et espèces bactériennes, comme *E. coli*, *Listeria*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter* et *Salmonella* (de Bruijn, 1992; Alves *et al.*, 2002 ; Spigaglia and Mastrantonio, 2003 ; Gan *et al.*, 2010).

### 3.2.5 Analyse de plusieurs loci VNTR (MLVA)

- **Principe**

La MLVA (Multi Locus Variable-number-tandem-repeat (VNTR) Analysis) est une méthode de génotypage basée sur l'analyse polymorphique de plusieurs *loci* de VNTR localisés sur le génome. Il s'agit de courtes séquences d'ADN répétées en plusieurs copies successivement sur un même *locus* dont le nombre varie en fonction des individus. Les VNTRs peuvent appartenir à la classe des microsatellites (entre 2 et 10 nucléotides) ou des minisatellites (entre 10 et 100 nucléotides). Ce sont des répétitions en tandem qui présentent un polymorphisme de longueur. Ils sont largement dispersés dans les génomes humains et bactériens (Lupski and Weinstock, 1992; van Belkum *et al.*, 1998; Vergnaud and Denoed, 2000). Dans les génomes bactériens, les *loci* de VNTR ont été localisés dans les régions non-codantes ainsi que dans les gènes. Les VNTRs peuvent être une source importante de polymorphisme génétique pour le typage des souches grâce à leur évolution rapide (van Belkum *et al.*, 1998; van Belkum *et al.*, 2001; Fournier *et al.*, 2004). Pour chaque *locus* de VNTR, le nombre de répétitions du motif peut être déterminé par amplification PCR en utilisant des amorces complémentaires qui vont s'hybrider sur les régions flanquantes conservées des VNTRs. La taille du fragment amplifié varie en fonction de la taille et du nombre d'unité répétées. Les amplicons sont observés après une migration électrophorétique

sur un gel d'agarose ou par électrophorèse capillaire. Le profil électrophorétique des amplicons peut être analysé pour révéler le génotype et inférer les relations phylogénétique des souches (Figure 13) (Keim *et al.*, 2000; Tenover *et al.*, 2007).



### Figure 13 : Principe de la technique MLVA

Sur un locus VNTR identifié au préalable, des amorces spécifiques vont s'hybrider au niveau des régions flanquantes du VNTR pour chaque souche étudiée (A,B et C). Après une amplification classique par PCR, les fragments sont déposés sur un gel d'agarose pour être séparés par migration électrophorétique. La taille des fragments amplifiés va dépendre du nombre de répétition en tandem (TR) présent dans le VNTR. Le nombre de TR peut varier d'une souche à l'autre au sein de la même espèce ce qui rend cette méthode très discriminante.

#### • *Avantages et inconvénients*

Bien que la MLVA soit une technique peu coûteuse, rapide, très discriminante avec une haute résolution pour le typage, et facilement reproductible, les VNTRs évoluent souvent trop rapidement pour fournir une relation phylogénétique fiable parmi les souches étroitement liées (Monot *et al.*, 2008). C'est pourquoi la MLVA est plutôt adaptée pour les études sur une

période courte (par exemple à l'échelle d'un épisode infectieux). D'autre part, cette approche peut se révéler beaucoup plus discriminante que les techniques ciblant un seul site, comme le ribotypage ou la PCR-RFLP. Elle est particulièrement adaptée pour les génomes qui évoluent peu. Enfin, un dernier avantage de cette approche est la possibilité de l'utiliser sans nécessité d'isoler la souche à typer, car les séquences des amorces peuvent être spécifiques de l'espèce. Cependant, comme il a été mentionné dans le paragraphe précédent, l'amplification des VNTRs nécessite l'utilisation d'amorces complémentaire qui vont s'hybrider sur les régions flanquantes. Le développement des amorces implique donc que la séquence du génome de la bactérie à typer soit connue. Bien qu'une multitude de séquences de génomes bactériens soit disponible dans les bases de données, le génome de certaines espèces bactériennes n'est pas encore séquencé. L'utilisation de cette méthode demande une vérification au préalable d'un certain nombre d'éléments pour qu'elle soit applicable. Plusieurs VNTRs peuvent être utilisés simultanément de façon à augmenter la discrimination intra-espèce si cela est nécessaire. Par exemple, une étude sur *B. anthracis*, agent responsable de l'anthrax, a montré que l'analyse par MLVA était plus discriminante avec 25 VNTR qu'avec huit VNTR (Le Fleche *et al.*, 2001; Lista *et al.*, 2006).

#### • *Applications*

Bien que la fonction biologique et les mécanismes d'évolution des VNTRs ne soient pas complètement connus, la MLVA a été largement utilisée pour l'identification épidémiologique des souches bactériennes, en raison de son important pouvoir de discrimination. Ainsi *B. anthracis* (Keim *et al.*, 2000; Le Fleche *et al.*, 2001; Lista *et al.*, 2006), *Clostridium difficile* (van den Berg *et al.*, 2007), *Brucella* spp (Le Fleche *et al.*, 2006), *Escherichia coli* (Sekse *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2013b), *Listeria monocytogenes* (Lunestad *et al.*, 2013), *Legionella pneumophila* (Visca *et al.*, 2011), *Yersinia pestis* (Le Fleche *et al.*, 2001) ainsi que d'autres agents pathogènes tels que *Mycobacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria* et *Salmonella* (Lindstedt, 2005) ont fait l'objet d'études avec cette approche. Pour certaines espèces, le typage avec la MLVA était plus discriminante que d'autres méthodes comme la PFGE (Killgore *et al.*, 2008) et la MLST (Killgore *et al.*, 2008; Haguenoer *et al.*, 2011). Ainsi la MLVA est utilisée dans de nombreux domaines d'applications notamment le typage des souches utilisées lors des attaques bioterroristes (Le Fleche *et al.*, 2006; Lista *et al.*, 2006) ou le typage des souches présentes sur les lignes de production alimentaire (Seale *et al.*, 2012; Dhakal *et al.*, 2013).

### 3.2.6 Amplification des fragments issus de restriction enzymatique (AFLP)

#### • *Principe*

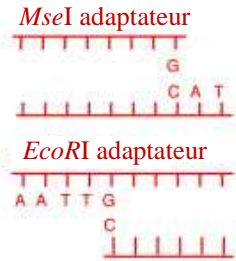
La méthode AFLP, ou « Amplification Fragment Length Polymorphism », a été décrite pour la première fois par Vos et Zabeau en 1993. Elle combine l'analyse par les enzymes de restriction avec une amplification par PCR (Figure 14). Cette technique est une méthode hautement sensible pour la détection du polymorphisme d'ADN bactérien (Vos *et al.*, 1995). Le typage par la méthode AFLP est réalisé en trois étapes. L'ADN génomique est tout d'abord hydrolysé par deux enzymes de restriction dont l'une a un site de restriction rare et l'autre un site spécifique retrouvé plus fréquemment dans le génome. La ligature des adaptateurs est ensuite réalisée aux extrémités spécifiques des fragments générés. Enfin, l'amplification des fragments de restriction est réalisée à l'aide d'amorces qui s'hybrident au niveau des adaptateurs du site de restriction. Comme pour les autres méthodes utilisant un profil ou une empreinte génétique, les fragments ADN peuvent être détectés par révélation de l'ADN après séparation électrophorétique sur gel d'agarose ou bien à l'aide d'un séquenceur d'ADN automatisé (Vos *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 2000). La méthode AFLP fluorescente (FALFP) est une variante de la technique conventionnelle qui utilise des amorces marquées par fluorescence pour l'amplification d'ADN et un séquenceur d'ADN automatisé pour la détection des fragments. Cela permet d'obtenir une résolution beaucoup plus élevée contrairement au système de détection classique avec la capacité d'identifier des fragments ADN dont la taille n'est différente que d'une seule paire de base (Zhao *et al.*, 2000; Mortimer and Arnold, 2001; Scott *et al.*, 2001). L'analyse assistée par ordinateur du nombre et de la taille des fragments générés pour chaque souche s'avère essentielle pour l'analyse phylogénétique.

**A) Préparation de la réaction**

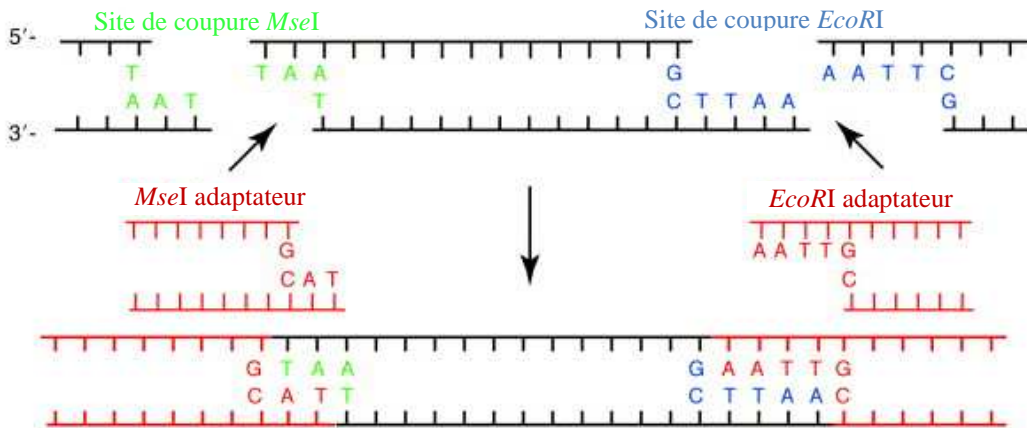
ADN génomique



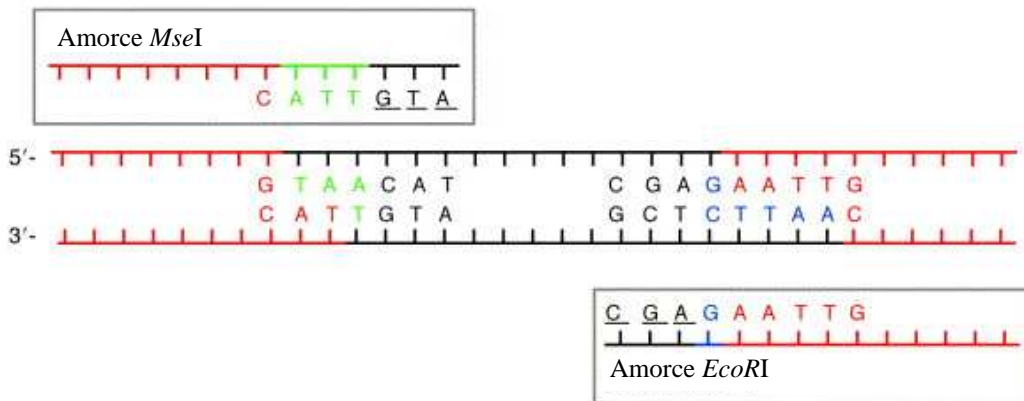
+ Enzymes de restriction (*MseI* et *EcoRI*) et ligase ADN



**B) Restriction enzymatique et ligation**



**C) Amplification sélective par l'utilisation d'amorce spécifique**



**Figure 14 : Principe de la méthode AFLP**

Dans un premier temps, l'ADN génomique est clivé par les enzymes de restriction sélectionnées. Des adaptateurs, dont une extrémité est identique au site de coupure des enzymes de restriction, vont se fixer de part et d'autre du fragment ADN sous l'action de la ligase. Ensuite, une amorce spécifique complémentaire de chaque adaptateur va pouvoir s'hybrider sur le fragment ADN puis va être amplifiée lors de la PCR. Enfin, les fragments ADN vont être révélés après une migration électrophorétique sur gel d'agarose.

- **Avantages et inconvénients**

Le pouvoir discriminant de l'analyse par AFLP est principalement déterminé par la combinaison des enzymes de restrictions choisies et le nombre de nucléotides des amorces. L'analyse *in silico* de séquences ADN génomique bactérien peut être utilisée pour déterminer la combinaison des enzymes de restriction et la séquence des amorces les plus informatives possible pour le typage bactérien (Keto-Timonen *et al.*, 2003; Rombauts *et al.*, 2003; Bikandi *et al.*, 2004; Kivioja *et al.*, 2005). Relativement peu de paires d'amorces sont utilisées pour visualiser un grand nombre de *loci* dans l'analyse AFLP. Les *loci* peuvent être amplifiés simultanément dans une seule réaction PCR. En règle générale, 50 à 100 fragments de restriction sont co-amplifiés pour obtenir un profil de bandes (Caballero *et al.*, 2013). Cette technique est robuste, reproductible et a été décrite comme étant autant discriminante que la PFGE, la RAPD et la RFLP mais plus discriminante que la MLST (Zhao *et al.*, 2000; Feberwee *et al.*, 2005; Gzyl *et al.*, 2005; Melles *et al.*, 2007). Le principal avantage est qu'elle ne requiert pas obligatoirement la connaissance de données de séquence génomique (Vos *et al.*, 1995; Mueller and Wolfenbarger, 1999). Elle exige cependant de l'ADN de bonne qualité pour s'assurer d'une bonne reproductibilité de la méthode. Le désavantage majeur de la méthode est la nécessité d'utiliser un équipement d'analyse automatisé lorsque le nombre de fragments est trop élevé (Mortimer and Arnold, 2001).

- **Applications**

L'AFLP a souvent été utilisé dans le typage de *Listeria monocytogenes* isolés de l'environnement ou d'échantillons alimentaires (Guerra *et al.*, 2002; Autio *et al.*, 2003; Parisi *et al.*, 2010). Cette méthode est également très utilisée pour les études épidémiologiques de nombreux pathogènes tels que *Clostridium* spp. (McLauchlin *et al.*, 2000; Keto-Timonen *et al.*, 2005; Keto-Timonen *et al.*, 2006), *Escherichia coli* (Arnold *et al.*, 1999; Lyoda *et al.*, 1999) et *Salmonella* spp. (Aarts *et al.*, 1998). Enfin, la haute résolution de la méthode ainsi que son fort pouvoir de discrimination a permis à certains auteurs d'utiliser l'AFLP pour déterminer les liens phylogénétiques entre les espèces (Garcia-Pereira *et al.*, 2010) et notamment au sein du genre *Klebsiella* (Jonas *et al.*, 2004).

Les méthodes basées sur l'analyse des profils de migration des fragments d'ADN sont largement utilisées pour le génotypage bactérien. Une seconde catégorie de méthode repose sur le séquençage de l'ADN par l'étude du polymorphisme des séquences.

### 3.3 Les méthodes basées sur le séquençage des gènes

#### 3.3.1 Typage à partir de gènes portés par plusieurs loci (MLST)

- **Principe**

La MLST (Multilocus Sequence Typing) est une technique basée sur les méthodes de séquençage d'ADN et vise à déterminer les variations alléliques dans plusieurs gènes conservés. Des fragments internes d'environ 500 pb de plusieurs, souvent sept, gènes, appelés gènes de ménage, sont séquencés pour chaque isolat. Cette longueur de fragment d'ADN a été choisie car le fragment peut être séquencé avec précision sur les deux brins en utilisant une seule paire d'amorces. Chez la plupart des bactéries pathogènes, cette longueur de fragment présente une variation suffisante pour identifier de nombreux allèles différents au sein de la population. Pour chaque gène, les différentes séquences sont affectées comme allèles et les allèles des sept *loci* fournissent un profil allélique, qui définit clairement un séquence-type (ST) de chaque isolat. Les séquences qui diffèrent, sur un même *loci*, d'un seul nucléotide sont assignées comme des allèles différents. Le nombre important d'allèles pour chaque *loci* étudié offre la capacité de distinguer des milliards de profil ST. Une souche qui porterait l'allèle le plus commun à chacun des sept loci serait rencontrée par hasard seulement une fois tous les 10 000 isolats. La plupart des profils alléliques sont donc très rares et il est très peu probable que deux isolats indépendants aient le même ST (Spratt, 1999).

Les liens de parentés entre les souches sont visualisés à l'aide d'un dendrogramme en utilisant une matrice qui va comparer les différences entre les profils alléliques deux à deux. Le dendrogramme est un moyen pratique pour identifier les isolats qui ont des profils alléliques identiques ou très similaires que l'on peut supposer être dérivés d'un ancêtre commun (Spratt and Maiden, 1999).

- **Avantages et inconvénients**

L'un des principes de la MLST est de se focaliser sur des gènes qui ne sont pas soumis à des pressions sélectives rares, et qui se diversifient lentement par l'accumulation aléatoire de variation neutre ou presque neutre. Ainsi, ils fournissent des informations beaucoup plus fiables sur les relations entre les isolats. Toutefois, ces gènes ont des séquences relativement uniformes de sorte que l'analyse d'un seul gène fournirait trop peu de discrimination pour être utilisé seul pour le typage moléculaire. C'est pourquoi l'utilisation de sept gènes de ménage est requise pour la MLST. L'avantage primaire de cette méthode est qu'elle est parfaitement



reproductible quel que soit le laboratoire puisqu'il s'agit de séquençage. Il n'y a pas d'ambiguïté d'interprétation des résultats comme avec des profils de migration multibandes. De plus, elle permet l'échange facile des données entre laboratoires. Actuellement, les bases de données MLST sont disponibles pour au moins 79 organismes dont 75 bactéries, trois champignons et un protozoaire (Pérez-Losada *et al.*, 2013). L'inconvénient majeur de la méthode MLST est la nécessité de connaître la séquence de régions conservées des gènes de ménage afin de pouvoir séquencer les fragments variables (Parkhill *et al.*, 2003). L'application de la méthode peut être limitée par le manque de diversité dans les génomes complets ou dans les gènes de ménage de certains pathogènes. Enfin, cette technique est encore coûteuse pour des analyses de routine.

#### • *Applications*

La popularité de la MLST est conduite par sa facilité d'utilisation et son pouvoir de discrimination. Par conséquent, ces dernières années il y a non seulement eu une augmentation dans la disponibilité des schémas de MLST et des séquences types, mais également une diversité du domaine d'application de la méthode. Bien qu'initialement développé pour l'identification de pathogènes par typage moléculaire (Maiden *et al.*, 1998), les données de séquences MLST ont été appliquées à d'autres aspects de l'épidémiologie moléculaire tels que la transmission de maladie (Martin *et al.*, 2012) ou l'évolution de la virulence (Matsunari *et al.*, 2012), ainsi que la santé publique avec le suivi des programmes de vaccination (Adetifa *et al.*, 2012). La méthode MLST est également utilisée dans d'autres domaines de recherche tels que la phylogénie, la taxonomie, la spéciation et la génétique des populations (Henssge *et al.*, 2011; Yeo *et al.*, 2011; Guinebretiere *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

#### 3.3.2 Séquençage de régions intergéniques (MST)

##### • *Principe*

La MST (Multispacer sequence typing) est une technique de génotypage basée sur le séquençage de plusieurs régions intergéniques hautement variables et qui a été récemment appliquée pour la première fois à *Yersinia pestis* en 2004 (Drancourt *et al.*, 2004). Cette méthode est basée sur le fait que les séquences d'ADN non codant, qui est moins sujet à la pression sélective, varient plus que celles des régions codantes, et de ce fait sont plus

discriminantes lors du typage de souches bactériennes (Li *et al.*, 2006). Les régions intergéniques utilisées comme marqueurs sont choisies parmi les régions non codantes variant le plus entre les génomes alignés de plusieurs souches au sein d'une même espèce bactérienne, ou entre les espèces proches si seulement un génome est disponible pour une espèce donnée (Drancourt *et al.*, 2004; Fournier *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2006). Avec l'accumulation rapide de séquences de génomes bactériens et l'augmentation du nombre d'espèces pour lesquelles deux génomes sont disponibles, les régions intergéniques hautement variables sélectionnées par comparaison des génomes deviennent plus représentatives et puissantes pour le typage des souches bactériennes (Li *et al.*, 2009). Après l'amplification et le séquençage, chaque variation de séquence d'ADN dans ces régions intergéniques fournit une séquence type (ST). L'association de plusieurs STs provenant de l'étude de chaque région intergénique permet d'obtenir un génotype MST qui va pouvoir être utilisé pour l'étude génotypique des souches. Bien que ce soient les mêmes conditions d'application que la MLST, elle est plus appropriée pour faire du typage sur des espèces dont le génome varie très peu. Cette technique a ainsi permis d'établir des corrélations fiables de génotypes MST avec une distribution géographique et des manifestations cliniques de souches (Drancourt *et al.*, 2004; Fournier *et al.*, 2004; Golesi *et al.*, 2013).

#### • *Avantages et inconvénients*

La MST est une méthode basée sur des techniques classique de PCR. Ainsi elle a le potentiel de pouvoir être utilisée directement sur des échantillons sans étape de culture bactérienne comme réalisé avec succès dans le typage de *Y. pestis* qui provenait de pulpe dentaire datant de 1500 ans (Drancourt *et al.*, 2004). Un autre avantage de la MST réside dans le fait que les amorces utilisées peuvent être choisies dans les régions conservées de part et d'autres des régions intergéniques. Enfin, une base de données disponible en ligne, MST-Rick, permet de comparer ses propres séquences de régions intergéniques et de déterminer des génotypes MST.

#### • *Applications*

La méthode MST a été appliquée avec succès sur plusieurs pathogènes de l'homme tels que *Y. pestis* (Drancourt *et al.*, 2004), *Rickettsia conorii* (Fournier *et al.*, 2004; Wenjun *et al.*, 2009), *Rickettsia prowazekii* (Zhu *et al.*, 2005), *Coxiella burnetii* (Mediannikov *et al.*, 2010),

*Bartonella henselae* (Yanagihara *et al.*, 2010) et *Bartonella quintana* (Foucault *et al.*, 2005). Récemment, la MST a été utilisé pour évaluer la diversité génétique de *B. henselae* et *R. conorii* directement à partir d'échantillons de ganglions humains (Li *et al.*, 2007). Bien que les régions intergéniques soient considérées comme des marqueurs évoluant rapidement, la MST a réussi à établir des corrélations fiables de génotype MST avec la distribution géographiques, les manifestations cliniques et l'épidémiologie des souches (Drancourt *et al.*, 2004; Fournier *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2011; Golesi *et al.*, 2013).

Bien que les méthodes de séquençages décrites ci-dessus décrivent au plus près les relations entre les souches, une troisième catégorie de méthode basée sur l'hybridation de l'ADN permet de déterminer le pourcentage d'homologie entre les souches étudiées.

### 3.4 Les méthodes basées sur l'hybridation ADN

#### 3.4.1 Hybridation ADN-ADN

- **Principe**

L'hybridation de l'ADN est fondée sur les propriétés d'appariements des bases complémentaires d'acides nucléiques. Ce principe est utilisé comme un outil de phylogénie pour déterminer les liens de parenté entre les espèces mais également pour différencier les espèces entre elles. La méthode se déroule en trois étapes. La dénaturation de l'ADN génomique (étape I) est entraînée par un chauffage progressif de la solution d'ADN double brin ce qui va provoquer la rupture des liaisons hydrogènes présentes entre les bases azotés des nucléotides et permettre la séparation des deux brins complémentaires. Deux liaisons hydrogènes sont établis entre les bases adénine/thymine (AT) et trois entre les bases cytosine/guanine (CG). L'énergie pour séparer les brins d'acides nucléiques dépend donc de leur longueur et de leur composition en AT et CG. La température à laquelle la moitié des molécules d'ADN est dénaturée est appelée température de fusion ( $T_m$ ). Deux brins monocaténaires issus de deux ADN différents sont mis en contact à température élevée (Etape II). En réduisant progressivement la température, des brins non spécifiques vont s'apparier. La molécule bicaténaire obtenue, appelée hétéroduplex, possède une proportion plus ou moins grande de bases complémentaires qui établissent entre elles de nouvelles liaisons hydrogènes. Enfin, les différents hétéroduplex sont chauffés progressivement (Etape III). La température

à laquelle 50 % des liaisons hydrogène sont rompues est mesurée puis comparée à celle de la molécule ADN témoin. Il y a proportionnalité entre l'écart de ces deux températures et le nombre de liaisons établies lors de l'hybridation. Plus la température de dénaturation est proche du Tm de la molécule ADN témoin, plus la similarité entre les bases complémentaires est grande et donc les espèces proches.

- ***Avantages et inconvénients***

Cette méthode est encore considérée aujourd'hui comme l'« étalon d'or » pour déterminer le niveau de parenté entre les espèces. C'est une méthode qui fournit une meilleure résolution que le séquençage de l'ADNr 16S (Stackebrandt and Goebel, 1994). Basée sur une hybridation de l'ADN, elle ne nécessite pas d'étape d'amplification.

- ***Applications***

Le pourcentage d'hybridation ADN-ADN est utilisé pour la délimitation des espèces. Les espèces bactériennes sont considérées comme des groupes de souches partageant 50 à 70% de réassociation d'ADN et 5 à 7% de la stabilité thermique des hétéroduplex (Ursing *et al.*, 1995). Cette méthode est la pierre angulaire de la taxonomie microbienne moderne. Elle est couramment utilisée pour faire évoluer la taxonomie et de nombreux exemples sont disponibles témoignant de son efficacité (Nazina *et al.*, 2001; Nazina *et al.*, 2005; Coorevits *et al.*, 2012)

### 3.4.2 Hybridation sur puces ADN

- ***Principe***

Les puces à ADN sont la miniaturisation de l'hybridation permettant d'identifier simultanément des milliers de molécules différentes d'acides nucléiques d'un micro-organisme. Le principe repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est porté face à un brin complémentaire (réaction d'hybridation). Une puce à ADN est un ensemble de molécules d'ADN rangées et fixées sur un support d'une petite surface qui peut être du verre, du silicium ou du plastique. Les molécules d'ADN fixées sur la lame sont appelées des *sondes* et peuvent être fixées par dizaines de milliers sur une même puce. L'incubation de la puce avec de l'ADN à étudier préalablement marqué par un colorant (soit la Cyanine 3 (fluorochrome vert) soit la Cyanine 5

(fluorochrome rouge)), conduit dans des conditions de stringence élevée, à leur hybridation avec les cibles correspondantes. Cette hybridation est détectée et localisée puis l'ensemble des signaux produits fait l'objet d'un traitement informatique. Il est donc possible d'obtenir des profils différents d'hybridation (reflétant des différences de séquences), voire la séquence d'un gène ou d'une portion de gènes, en fonction des *sondes* oligonucléotidiques hybridées. Le choix des *sondes* synthétisées sur la puce sera fonction du gène ou du génome étudié.

#### • *Avantages et inconvénients*

Les puces à ADN semblent être le point ultime de l'évolution des techniques de biologie moléculaire appliquées à la microbiologie. Une biopuce est un outil très puissant pour l'étude du transcriptome ainsi que la diversité bactérienne. Il existe deux types de puces à ADN : les macroarrays et les microarrays, qui diffèrent en fonction de la taille et du nombre de *sondes* déposées sur le support. Les macroarrays peuvent contenir jusqu'à 5000 *sondes* et les microarrays jusqu'à un million. La méthode des puces à ADN s'avère être rapide, spécifique et efficace. La production des puces nécessite cependant un appareillage spécifique et coûteux y compris pour la détection de l'hybridation.

#### • *Application*

La technique des puces à ADN est rapidement devenue un outil efficace pour l'étude du transcriptome (Severino *et al.*, 2007; Gaillard *et al.*, 2010) et la diversité génétique des bactéries (Hacia, 1999; Garaizar *et al.*, 2006). Elle a également été utilisée pour la détection de bactéries pathogènes responsable d'intoxication alimentaire telles que *Listeria monocytogens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Shigella* spp. et *Clostridium perfringens* dans le lait et la viande (Chiang *et al.*, 2012; Kupradit *et al.*, 2013). Une puce a également été construite en utilisant les séquences ADN du génome partiel de 34 souches isolées d'aliments altérés comprenant les espèces *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sporothermodurans*, *B. cereus*, *Bacillus coagulans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermocatenulatus*, *Geobacillus toebii* et *Geobacillus* sp., (Caspers *et al.*, 2012).

## Chapitre 2

### Matériel et Méthodes

#### 1.1 Les souches et les conditions de cultures

##### 1.1.1 *Geobacillus stearothermophilus*

Un total de 155 isolats de *G. stearothermophilus* était disponible dans la collection du CTCPA (cf. Chapitre 3, Supplementary **Table S1**) Parmi ceux-ci, 144 isolats ont été isolés de conserves alimentaires non stables à 55°C entre 2001 et 2010 (André *et al.*, 2013). Six isolats ont été obtenus à partir de prélèvements effectués sur une ligne de transformation de légumes. Les isolats ont ensuite été stockés à -80°C dans des tubes contenant des cryobilles et une solution de conservation (AES Chemunex, Bruz, France). L'ensemble des isolats a été identifié comme *Geobacillus stearothermophilus* soit à l'aide d'une méthode d'amplification d'ADN spécifique appelé SporeTraQ™ (Prevost *et al.*, 2010) qui cible une région d'ADN correspondant à une séquence interne transcrite du gène codant l'ARNr 16S-23S, ou par le séquençage partiel de la région codant l'ARNr 16S. Cinq souches de *G. stearothermophilus* ont été obtenues de la collection DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany). La DSM 22 et la DSM 297 ont été isolées de conserves altérées alors que l'origine des DSM 5934, DSM 2313 et DSM 6790 n'est pas spécifié.

Deux à trois billes des stocks de conservation ont été déposées dans un bouillon cœur-cerveille (BHI) avant d'être incubé pendant 48h à 55°C. Un volume de 500 µL de cette pré-culture a été inoculé dans un bouillon BHI puis placé à 55°C pendant 16h. Cette pré-culture finale a été utilisée pour les inoculations suivantes.

##### 1.1.2 *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica*

Un total de 142 isolats de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* était disponible dans la collection du CTCPA (cf. Chapitre 4, 2.3.1 **Table 1**). Parmi ces isolats, 135 ont été isolés de conserves alimentaires non-stables à 55°C entre 2001 et 2010 (André *et al.*, 2013). Cinq isolats ont été obtenus à partir d'échantillons de sols prélevés sur des parcelles de terre où sont cultivés des légumes en Bretagne. L'ensemble de ces isolats a été identifié comme *M. thermoacetica/thermoautotrophica* par PCR spécifique ou séquençage partiel de la région

codant l'ARNr 16S. Une souche a été obtenue à partir de la collection DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany). La DSM 521 est la souche type. Elle a été isolée en 1942 de fumier de cheval. Enfin, une dernière souche a été obtenue à partir de la collection ATCC (American Type Culture Collection, Molsheim, France). L'origine de la souche *M. thermoacetica* ATCC 39073 n'est pas connue mais son génome a été entièrement séquencée en 2008 (Pierce et al., 2008). Les isolats ont été stockés à -80°C dans une solution cryogénique de conservation avec des billes (AES Chemunex, Bruz, France).

Deux à trois billes des stocks de conservation ont été déposées dans un bouillon de Rosenow modifié (complémenté 1g/L d'amidon soluble) dans un tube autoclavé et dégazé dans un bain d'eau à 100°C pendant 10 minutes (ROSmP) (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) pour créer l'anaérobiose. Cette dernière est conservée en coulant une couche de paraffine en surfusion dans le tube avant incubation à 55°C pendant sept jours. Un volume de 500 µL de cette pré-culture a été inoculé dans un bouillon ROSmp placé dans les mêmes conditions d'anaérobiose avant d'être incubé cinq jours à 55°C. Cette pré-culture finale est utilisée pour les inoculations suivantes.

## 1.2 Protocoles d'extraction d'ADN génomique

Pour *G. stearothermophilus*, 100 µL de la pré-culture finale est étalée sur une gélose dextrose tryptone agar (DTA) et incubé pendant 16h à 55°C. Pour *M. thermoacetica/thermoautotrophica*, un volume de 200 µL de la pré-culture de cinq jours est étalé sur une gélose Viande-Foie base modifié (complémenté de 2g/L d'extrait de levure, 1g/L d'amidon soluble et 9g/L d'agar) avant d'être incubé à 55°C pendant sept jours dans des boîtes avec des générateurs d'anaérobioses Genbox Anaer (Biomérieux, Craponne, France). Les colonies obtenues vont servir pour les extractions d'ADN suivantes.

### 1.2.1 Extraction d'ADN par la méthode InstaGene™

L'identification des colonies sur boîtes obtenues après une étape d'isolement est réalisée à partir d'un échantillon ADN extrait avec le kit InstaGene™ Matrix (BioRad). Pour cela, une oese de cultures bactériennes est mise en solution dans 100 µL d'eau stérile. Un volume de 200 µL de matrix InstaGene™ est ajouté dans le tube qui est vortexé puis incubé 25 min à 56°C. Après agitation, le tube est placé à 98°C pendant 8 min. L'ADN est récupéré dans le

surnageant après une centrifugation à 13 000 rpm pendant 1 minute. L'ADN est placé à -20°C jusqu'à son utilisation.

### 1.2.2 Extraction d'ADN par la méthode au phénol/chloroforme

L'ADN des souches bactériennes a été extrait selon le protocole établi précédemment (Guinebretiere *et al.*, 2003). Brièvement, deux oeses de culture bactériennes sont directement suspendues dans 550 µL de tampon d'extraction (1,7% sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA, 200 mM NaCl). La suspension est incubée à 55°C pendant 30 min pour les souches de *G. stearotherophilus* et 1h pour les souches de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* en présence de 25 µL de protéinase K (10 µg/µL). L'ADN est extrait avec un volume de phénol. Après une centrifugation 10 000 × g pendant 5 min, le surnageant contenant l'ADN est mélangé avec un volume de phénol puis centrifugé de nouveau 10 000 × g pendant 5 min. Un volume de chloroforme est ajouté au surnageant, centrifugé 10 000 × g pendant 5 min puis le surnageant est placé dans 875 µL d'éthanol absolue à -20°C puis laissé pendant 16h à -20°C. Après centrifugation 10 000 × g pendant 20 min, le culot d'ADN est lavé avec 1000 µL d'éthanol 70% à -20°C. L'ADN est ensuite réhydraté dans 50µL d'eau milliQ ultra pure stérile puis incubé 15 min à 37°C avec 2 µL de RNase A (0,7U/µL). L'ADN est quantifié par lecture de l'absorbance à 260nm (NanoQuant Plate™ Infinite® M200, Tecan Autriche). L'échantillon est stocké jusqu'à son utilisation à -20°C.

## 1.3 Typage moléculaire

### 1.3.1 La méthode M13-PCR

La méthode utilisée suit le protocole précédemment décrit par Guinebretiere *et al.*, (2003). Le mélange réactionnel est composé de 50 ng d'ADN, 4,8 µM d'amorce PM13 : 5'-GAGGGTGGCGGCTCT-3' (Eurogentec S.A., Seraing, Belgium), 6 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 1,25 mM de chaque dNTPs (Eurogentec), 10% (vol/vol) dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) et 1,5 U d'enzyme ADN polymérase Diamond *Taq*<sup>®</sup> (Eurogentec) dans le tampon du fournisseur. L'amplification ADN a été réalisée dans le thermocycleur GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Les paramètres du cycle PCR comprenaient une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes suivie de 35 cycles constituées d'une étape à 94°C pendant 1 minute, 40°C pendant 1 minute et 68°C pendant 8 minutes, ainsi qu'une étape d'extension finale à 68°C pendant 16 minutes. Un contrôle négatif comprenant de l'eau



milliQ ultra pure stérile à la place de l'échantillon ADN et un contrôle positif avec de l'ADN de *Bacillus cereus* ATCC 14579 produisant un profil de bande connu étaient inclus dans chaque PCR.

Les produits d'amplifications sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% avec le marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec). Les gels sont colorés à l'aide du Bromure d'Ethidium puis visualisés et photographiés sous UV dans un gel imager (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System 170-8170, BioRad, France). La détection des bandes, le coefficient de similarité et le dendrogramme sont déterminés avec le logiciel BioGene 99.04 (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Un dendrogramme a été construit à partir de la similarité des profils de bandes obtenus avec la méthode M13-PCR. Le témoin positif *B. cereus* ATCC 14579 a été choisi afin d'évaluer la variabilité générée par les analyses (PCR, électrophorèse, analyse d'image). Les produits d'amplifications des témoins positifs ont été déposés sur chaque gel et les profils de bandes ont été comparés pour déterminer l'intervalle de confiance du dendrogramme.

### 1.3.2 La méthode REP-PCR

La méthode de typage REP-PCR a été utilisée comme précédemment décrit par Versalovic *et al.*, 1994. Le volume total de la réaction de 25µL contenait 50 ng d'ADN, 2,4 µM de chaque amorce REP 1R-I (5' III IGC ICG ICG ICA TCI GGC 3') et REP 2-I (5' ICG ICT TAT CIG GCC TAC 3') (Eurogentec), 1,25 mM de chaque dNTPs (Eurogentec), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma- Aldrich), 10% (vol/vol) dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich) et 1,5 U d'enzyme ADN polymérase Diamond *Taq*® (Eurogentec) dans le tampon du fournisseur. L'amplification ADN a été réalisée dans le thermocycleur GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). Les paramètres du cycle PCR comprenaient une étape de dénaturation à 94°C pendant 3 minutes suivie de 35 cycles constituées d'une étape à 94°C pendant 1 minute, 40°C pendant 1 minute et 65°C pendant 8 minutes, ainsi qu'une étape d'extension finale à 65°C pendant 16 minutes. Un contrôle négatif comprenant de l'eau milliQ ultra pure stérile à la place de l'échantillon ADN et un contrôle positif avec de l'ADN de *Bacillus cereus* ATCC 14579 produisant un profil de bande connu étaient inclus dans chaque PCR.

Les produits d'amplifications sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1,5% avec le marqueur de poids moléculaire Smart Ladder (Eurogentec). Les gels sont

colorés à l'aide du Bromure d'Ethidium puis visualisés et photographiés sous UV dans un gel imager (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System 170-8170, BioRad, France).

### 1.3.3 La méthode MLVA

Le programme « The Microorganisms Tandem Repeats Database » (TMTRD) (Grissa *et al.*, 2008), disponible en ligne: <http://minisatellites.u-psud.fr>, a été utilisé pour identifier les régions répétées sur le génome de *Moorella thermoacetica* ATCC 39073. Un total de 19 loci VNTR a été potentiellement identifié, et neuf loci ont été choisis en fonction de la taille de la séquence répétée (100-500 bp) et du nombre de copie (>2). Neuf couples d'amorces ont été développés à partir des régions flanquantes de part et d'autre (500 pb) du loci VNTR en utilisant le logiciel en ligne : Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Les couples d'amorces ont été désignés Moo-A à Moo-I (cf. chapitre 4, 2.3.2, table 2) Le mélange réactionnel (25 µL) de 5 µL d'ADN extrait avec la méthode InstaGene™, 0,2 mM d'un mélange des quatre dNTPs (Eurogentec), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 2 U d'enzyme polymérase Diamond *Taq*® DNA (Eurogentec) dans le tampon du fournisseur et 0,4 µM of de chaque amorces. Les paramètres du cycle PCR comprenaient une étape de dénaturation de 5 min à 94°C suivie de 35 cycles constitués d'une étape de 1min à 94°C, 1 min à 53°C et 1 min à 72°C ; et une extension finale de 10 min à 72°C.

### 1.3.4 Séquençage du gene *panC*

Les oligonucléotides utilisés pour l'amplification du gène *panC* codant la pantoate-β-alanine ligase étaient : PCF3, 5'-TCGGDTTYGTNCCGACGATGG-3' and PCR1, 5'-AAABCGVACGGCVACVCGCA-3'. Ces amorces ont été développées à partir de l'alignement des séquences des gènes *panC* de plusieurs *Geobacillus* sp. (Numéros d'accession: CP001794, CP002442, CP002050, CP001638, CP002293, NC\_006510, et CP003125). La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume final de 25 µl contenant 50 ng d'ADN, 0,2 mM de dNTP (Eurogentec), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de chaque amorce et 0,5 U d'enzyme ADN polymérase Diamond *Taq*® (Eurogentec) dans le tampon du fournisseur.

Le programme d'amplification commençait avec une étape à 94°C pendant 4 min suivi de 35 cycles à 94°C pendant 40 s, 64°C pendant 40 s et 72°C pendant 1 min ; et une extension finale à 72°C pendant 10 min. Les produits d'amplifications ont été purifiés avec le kit High Pure PCR Product Purification selon les recommandations du fournisseur (Roche, France). Le séquençage partiel du gène *panC* a été fait avec l'amorce PCF3 par Eurofins MWG Operon

(Courtaboeuf, France) selon la méthode classique de Sanger. Les séquences *panC* ont été enregistrées dans la base de données GenBank avec un numéro d'accèsion (cf. article 1).

L'alignement des séquences a été effectué avec Clustal Omega sur EBI-EMBL (Goujon *et al.*, 2010; Sievers *et al.*, 2011). Le pourcentage d'identité a été calculé entre ces séquences ainsi que les séquences *panC* d'autres bactéries thermophiles formant des spores (numéros d'accèsion: NC\_006274, NC\_004722, NC\_003909, NC\_006510 et CP000232).

## 1.4 Caractérisation phénotypique

### 1.4.1 Croissance à différents pH et Température

#### • *G. stearothermophilus*

La pré-culture finale de *G. stearothermophilus* a été diluée au 100<sup>ème</sup> dans de l'eau peptonée pour obtenir une solution de 10<sup>5</sup> UFC/ mL. Une goutte (10 µL) de la suspension bactérienne a été ainsi déposée sur une gélose dextrose tryptone agar (DTA). Comme *G. stearothermophilus* se développe facilement sur des milieux de routine, le DTA est choisi car sa couleur de base est plus stable aux températures élevées. Les boîtes sont enveloppées dans du papier aluminium pour éviter l'évaporation puis incubées pour un maximum de 14 jours. La croissance a été testée pour les combinaisons de température d'incubation (45°C, 50°C, 55°C ou 70°C) et de pH (6,5 ; 6,0 ; 5,5 ; 5,0 ; 4,8 et 4,5). La croissance à 40°C a été testée seulement dans le DTA à pH 6,5. L'ajustement du pH initial du milieu a été réalisé avec du HCl 2N (Fischer Scientific SAS, Illkirch, France) après la stérilisation. La croissance des souches a été considérée comme positive lorsque la taille de la colonie était supérieure à 1 mm. Le développement bactérien a été examiné toutes les 48 h jusqu'à 14 jours. Les souches testées négativement ont été incubées dans 10 ml de bouillon dextrose tryptone (DTB). Un volume de 500 µL de la pré-culture (10<sup>5</sup> UFC/mL) de 16h à 55°C a été inoculé dans le DTB à 37, 39, 40, 70, 72 ou 75°C pendant un maximum de 14 jours. La croissance bactérienne a été contrôlée toutes les 24 h à l'aide d'une méthode de dénombrement par dilution du milieu d'incubation sur gélose DTA à 55°C. La croissance des souches est considérée négative lorsqu'aucun développement n'est obtenu ni dans le DTB ni sur le DTA après 14 jours d'incubation. Toutes les conditions ont été testées en triplicats pour s'assurer de la répétabilité des résultats.

- *M. thermoacetica/thermoautotrophica*

Un volume de 500µL de la pré-culture ( $10^5$  UFC/mL) de cinq jours en ROSmp de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* a été inoculé dans un bouillon de dextrose tryptone (DTB). Ce milieu est utilisé car il peut être acidifié pour tester les différentes conditions de pH testées. De plus, ce milieu est composé 0,6% d'agar ce qui permet de faciliter la détection de la croissance bactérienne avec l'apparition d'un trouble le long du tube. Le pH initial du milieu a été ajusté après la stérilisation avec l'addition de HCl 2N (Fischer Scientific SAS, Illkirch, France). La croissance a été testée en anaérobiose pour les combinaisons de température (50, 55°C) et pH (4,5 ; 5,0 ; 5,5 ; 6,0 ; 7,0). Les conditions de croissance aux températures 40, 45, 65, et 70°C ont été testées à pH 7. Le pH 4,5 a également été testé à 68°C. Le développement bactérien a été examiné toutes les 24 h jusqu'à 21 jours.

#### 1.4.2 Croissance à différentes concentrations de chlorure de sodium

La capacité de se développer à différentes concentrations de NaCl (chlorure de sodium) a été testé uniquement pour *G. stearothermophilus*. Le milieu DTA était complété de NaCl pour obtenir des concentrations finales comprises entre 1 à 5% (wt/vol). La méthode de la goutte précédemment décrite a été utilisée pour inoculer le milieu DTA. L'activité de l'eau ( $a_w$ ) a été mesurée pour chaque concentration de NaCl (AquaLab, Biotrace International SAS). L'incubation est réalisée à 55°C pour un maximum de 14 jours. La croissance des souches est considérée positive lorsque la taille des colonies à la surface de la gélose était supérieures à 1 mm.

#### 1.4.3 Résistance aux antibiotiques

Un volume de 500 µL de la pré-culture ( $10^5$  UFC/mL) de cinq jours en ROSmp de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* a été inoculé dans un bouillon de dextrose tryptone (DTB) contenant un antibiotique. Les cinq antibiotiques ont été testés avec des concentrations comprises entre 2 et 4 µg/mL pour l'ampicilline, l'érythromycine, la cyclosérine et la tétracycline et entre 0,5 et 32 µg/mL (0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 4,0 ; 8,0 ; 16,0 et 32,0 µg/mL) pour la méthicilline. La croissance bactérienne, évaluée par la présence d'un trouble du milieu, a été suivie durant 23 jours d'incubation en anaérobiose à 55°C.

#### 1.4.4 Sporulation et thermorésistance

Pour la production de spores, un volume de 2 mL de la pré-culture est étalé sur un milieu de sporulation (MS). Pour *G. stearothermophilus*, le MS était préparé avec 10 g/L d'extrait de viande, 2 g/L d'extrait de levures, 0,04 g/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  et 15 g/L d'agar et celui de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* était le milieu Viande-Foie sulfito-réducteur modifié (complémenté de 2 g/L d'extrait de levure = VFSRm).

Les boîtes de *Moorella* ont été incubées en anaérobiose pendant trois semaines à 55°C puis une semaine à température ambiante tandis que les boîtes de *Geobacillus* ont été incubées en aérobie à 40, 45, 55 et 70°C. Le pourcentage de spore libre a été évalué au microscope optique avec un grossissement  $\times 1000$  sur un total de 10 champs observés. Les spores ont été récupérées lorsque le pourcentage de spore libre était supérieur à 50%. Les spores récupérées ont été lavées avec 5 mL d'eau distillée stérile, culotées à  $1400 \times g$  pendant 20 minutes à 4°C puis resuspendues dans 5 mL d'eau distillée stérile. Cette étape a été réalisée quatre fois. Les cellules végétatives résiduelles et les spores germées ont été éliminées avec un traitement thermique à 100°C pendant 10 minutes. La suspension de spores est ensuite stockée pendant 15 jours à 4°C. Le dénombrement de la suspension de spores a été réalisé après une étape thermique d'activation des spores à 100°C pendant 10 minutes.

La thermorésistance des spores de *G. stearothermophilus* et de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* a été évaluée à 120 et 130°C respectivement. Le traitement thermique des spores a été réalisé dans des tubes capillaires en verre de 50  $\mu\text{L}$  pendant les différents temps 0,5 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 3,5 ; 4 ; 6 ; 8 et 10 minutes. Le dénombrement des spores survivantes a été réalisé par des séries de dilutions successives dans du tampon phosphate 0,2M puis étalées selon l'espèce sur du milieu Bromocrésol pourpre (BCP) (*Geobacillus*) ou Viande Foie Sulfito-Réducteur modifié (VFSRm) (*Moorella*). Une seconde couche de milieu en surfusion est étalée avant d'être incubé à 55°C pendant deux à sept jours. Des courbes de destruction thermiques représentant la quantité de spores ayant survécu en fonction du temps de chauffage ( $\log \text{UFC/mL} = f(t)$ ) ont été établies et sont représentées dans chaque article du manuscrit.

### 1.5 Etude de l'écologie microbienne d'une ligne de production industrielle

#### 1.5.1 Echantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés dans une usine située en Bretagne sur une ligne de production de petit pois et carottes. Ces échantillons comprennent les légumes à différentes

étapes de la transformation, de liquides du procédé de transformation et des échantillons de surface du matériel de traitement ainsi que neuf échantillons de sol recueillis sur des parcelles de terre au cours de la période de pois verts visant à la production (*cf.* Chapitre 5, 2.3.1 **Figure 1**).

Les petits pois non traités ont été lavés par immersion successive dans l'eau, blanchis dans l'eau chaude (95°C) et transférés vers la machine de remplissage pour être remplis dans des boîtes. Les carottes sont lavées à l'eau, pelées, puis ajoutées dans des boîtes déjà partiellement remplies avec les petits pois. A ce stade, la saumure (environ 2% de sel et 4% de sucre dilués dans l'eau) est versée dans les boîtes de conserve remplies. Les boîtes sont scellées puis stérilisées par la chaleur avec un temps de chauffage équivalent à 121°C F<sub>0</sub> de 10-15 min avant d'être stockées à température ambiante. Les échantillons solides et liquides ont été recueillis avec des instruments stériles et directement versés dans des flacons en plastique stériles. Pour l'échantillonnage des surfaces, une éponge sèche stérile a été humidifiée avec 10 mL de diluant pharmacopée au thiosulfate de sodium (VWR BDH Prolabo, Fontenay sous-bois, France) puis passée sur une surface d'environ 100 cm<sup>2</sup>. Les petits pois et les carottes non-traités ont été échantillonnés au niveau de la plate-forme de réception. Les petits pois lavés et calibrés ont été prélevés immédiatement avant le blanchiment. Les petits pois blanchis ont été échantillonnés immédiatement après le blanchiment, dans le flux de production et à l'extérieur du flux dans les débris latéraux, puis au cours du transfert sur un tapis de convoyage comme débris latéral. Les carottes pelées ont été échantillonnées séparément avant le remplissage. Les petits pois et les carottes ont été prélevés dans le récipient après le transfert vers la machine de remplissage et après l'addition de la saumure de recouvrement juste avant la stérilisation. L'eau de blancheur et la saumure de recouvrement ont été échantillonnées séparément. L'excès de saumure est recueilli dans le réservoir de saumure. La température de chaque échantillon a été enregistrée avec un thermomètre digital (Fisher, Illkirch, France) immédiatement après le prélèvement sauf pour les carottes pelées. Les échantillons ont été prélevés en trois exemplaires, c'est à dire au début de la journée de production (environ 9-10 h), au milieu (14-15 h) et une heure avant l'arrêt de la production (approximativement 21h). Les échantillons de surface ont été recueillis sur la paroi du blancheur, sur les tapis de convoyages utilisés pour le transfert du petit pois et sur la paroi de la cuve de récupération de la saumure. Ces prélèvements d'échantillon de surface ont eu lieu entre la fin de la production journalière du jour et immédiatement avant le début du nettoyage de la ligne de production. Tous les échantillons ont été stockés à 4°C

immédiatement après le prélèvement et envoyés en convoi réfrigéré au laboratoire dans les deux jours. Ils ont ensuite été congelés et conservés à -20 ° C jusqu'à l'analyse.

### *1.5.2 Préparation des échantillons pour l'analyse microbiologique*

Les échantillons ont été décongelés à 4°C le jour avant l'analyse. Une quantité de 10 g d'échantillons solides a été mélangée à 90 ml de bouillon Rosenow (modifié par addition de 1 g/L d'amidon (ROSm)) (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) dans un BagFilter™ stérile (Interscience, Saint Nom, France). Les échantillons dilués ont été homogénéisés pendant 30 secondes à l'aide d'un BagMixer™ (Interscience). Le filtrat du BagFilter™ a été utilisé pour le dénombrement et la détection des microorganismes ciblés. Les échantillons liquides ont été utilisés directement. Les éponges utilisées pour l'échantillonnage de surface ont été placées dans des sacs stériles et recouvertes de 90 mL de ROSm, puis homogénéisées pendant 30s. Le filtrat a été récupéré après essorage manuelle de l'éponge.

### *1.5.3 Dénombrement des spores anaérobies*

Un volume de 2,2 ml du filtrat obtenu est placé dans une ampoule en verre scellée et traitée thermiquement pendant 10 min à 106°C dans un bain d'huile régulé en température pour la sélection des spores de bactéries anaérobies thermophiles (SAT) hautement thermorésistantes (THT). Un volume de 1,5 ml du filtrat est versé dans un tube Eppendorf de 1,7 ml et traité thermiquement pendant 10 min à 100°C dans un bloc chauffant Stuart® SBH130DC Digital Block Heater (Bibby Scientific, Staffordshire, United Kingdom) pour la sélection des spores de bactéries anaérobies thermophiles (SAT).

Les échantillons traités thermiquement ont été dilués en série dans un bouillon tryptone sel puis 1 mL de la dilution est étalé sur une gélose de milieu VFSRm (Biokar diagnostic, Beauvais, France). Les géloses ont été incubées à 55°C pendant 5 jours dans des boîtes anaérobies utilisant des générateurs d'anaérobie Genbox Anaer (Biomérieux, Craponne, France). La numération des spores a été calculée avec un seuil de détection de 10 SAT/g et 10 THT/g pour les échantillons solides, 1 SAT/mL et 1 THT/mL pour les échantillons liquides et 1 SAT/cm<sup>2</sup> et 1 THT/cm<sup>2</sup> pour les échantillons de surface.

#### 1.5.4 Prévalence de *G. stearothermophilus*, *M. thermoacetica/thermoautotrophica* et *Thermoanaerobacterium* spp.

Les échantillons dilués dans le ROSm ont été traités pendant 30 min à 100°C puis incubés pendant 4 jours à 55°C pour l'enrichissement. Un volume de 1 ml de l'enrichissement a ensuite été utilisé pour extraire l'ADN total avec le kit InstaGene™ (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) en suivant les instructions du fournisseur comme décrit dans le paragraphe 1.2.1. La détection spécifique de *G. stearothermophilus*, *M. thermoacetica/thermoautotrophica* et *Thermoanaerobacterium* spp. a été réalisée avec la méthode de PCR spécifique SporeTraQ™, comme précédemment développée (Prevost *et al.*, 2010). La taille des produits d'amplification était de 302 pb, 467 pb et 487 pb correspondant à *G. stearothermophilus*, *M. thermoacetica / thermoautotrophica* et *Thermoanaerobacterium* spp., respectivement. Toutes les étapes d'amplification ont été réalisées dans un volume total de 25 µL avec le thermocycleur GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems, USA). Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse dans du tampon TAE (Tris-acétate-EDTA) sur gel d'agarose à 1 %.

Ce procédé d'extraction/amplification permet d'avoir un seuil de détection de 10 spores par mL de bouillon d'enrichissement (Prevost *et al.*, 2010). Le seuil de détection a été estimé à une spore par gramme d'échantillon soumis à l'enrichissement (Sevenier *et al.*, 2012).





## Chapitre 3

### 1. Etude de la diversité génétique et phénotypique de *Geobacillus stearothermophilus* responsable d'altération des conserves

#### 1.1 Objectifs et choix méthodologiques

Les bactéries anaérobies thermophiles sont les principales causes de non-stabilité des conserves alimentaires à 55°C. *Geobacillus stearothermophilus* est l'une des trois espèces les plus retrouvées puisqu'elle est responsable de 35% de cas d'altération dans les conserves peu acide (André *et al.*, 2013). Son développement dans les conserves alimentaire entraîne un « flat sour » ou surissement sans bombage. Cette altération correspond à une fermentation des saccharides du produit alimentaire sans production de gaz. Sa présence dans les conserves est due à la capacité des spores produites de résister au processus de stérilisation appliqué en fin de ligne de production. Malgré les efforts réalisés par les industriels pour détruire ces spores par l'augmentation progressive des barèmes de traitement thermique, elles continuent de causer des altérations sur le produit fini ce qui impacte l'image des entreprises. Aujourd'hui, les professionnels veulent comprendre pourquoi et comment ces bactéries arrivent à atteindre de telles populations dans les produits avant appertisation. Pour cela, des connaissances sur l'espèce *G. stearothermophilus* formant des spores thermorésistantes sont nécessaires pour trouver des éléments de réponses à ces questions.

Les questions posées sur la diversité des isolats de conserverie peuvent être déclinées sur trois niveaux :

- Quelles conditions de température, pH et concentration en sels permettent-elles la croissance et la sporulation ?
- Quelles sont les conditions de sporulation les plus favorables pour la formation de spores ?
- Quelles sont les valeurs de thermorésistance des spores ?

Ainsi l'objectif de cette étude était de caractériser la diversité génétique et phénotypique de souches de *G. stearothermophilus* isolées de conserves non-stables à 55°C à partir de la collection établie au CTCPA sur une période de 10 ans. Cette collection était disponible avec la traçabilité sur l'origine des souches (usine, produit, année). Il a été décidé d'étudier la diversité phénotypique en se basant sur la diversité des origines et sur la diversité génétique :

un panel, interne à la collection, de souches d'origine différente telle que l'année, le lieu géographique et même l'usine dans laquelle a été isolée la souche ainsi que de profil génétique différent (M13-PCR) a été sélectionné ensuite pour l'étude phénotypique.

Pour l'étude de la diversité génétique, trois méthodes de typage ont été testées sur l'ensemble des 127 isolats de la collection. La MLVA est une technique qui nécessite la connaissance de la séquence du génome pour le design des amorces spécifiques de l'espèce à caractériser. Celui de *G. stearothermophilus* n'était pas disponible dans sa totalité mais des contigs permettaient une recherche de régions répétées en tandem et le design d'amorces dans les régions flanquantes. L'application de cette méthode n'a donné aucun résultat concluant et n'a donc pas été reportée ici. En revanche, la M13-PCR et la REP-PCR, qui sont des méthodes basées sur l'amplification de séquences répétées connues sur le génome ont été appliquées avec succès. Le séquençage du gène *panC* est venu compléter l'analyse pour différencier les groupes génétiques.

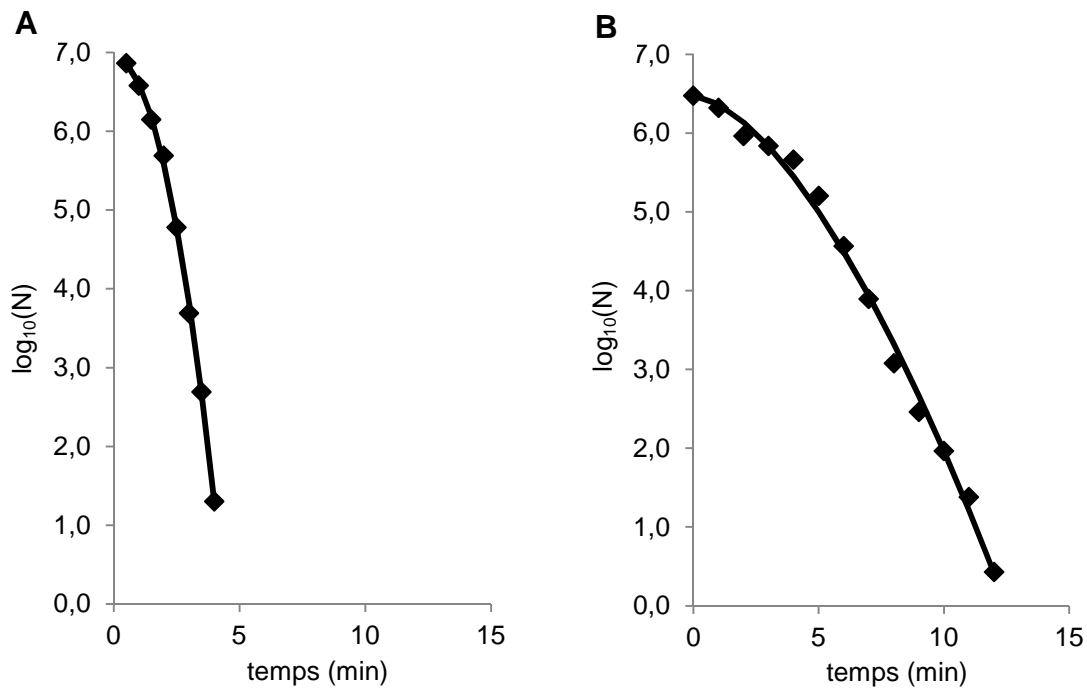
Les caractères phénotypiques que sont la température, le pH, et la teneur en chlorure de sodium permettant la croissance et la sporulation, ainsi que la thermorésistance des spores ont été déterminés sur une vingtaine de souches sélectionnées.

## 1.2 Principaux résultats

Les résultats du typage avec la M13-PCR ont permis de mettre en évidence une faible diversité génétique au sein de l'espèce *G. stearothermophilus*. Ces données sont renforcées, pour un sous-groupe de souches, par le résultat du séquençage du gène *panC*, et par l'application de la méthode de REP-PCR. Toutefois, la méthode de M13-PCR a permis de différencier six groupes génétiques parmi les 127 isolats de la collection. Cette méthode pourrait ainsi être utilisée pour caractériser l'écologie de *G. stearothermophilus* au cours d'un procédé de transformation.

L'étude des caractères phénotypiques de souches sélectionnées dans les différents groupes a révélé une faible variabilité. Leur capacité à se développer selon le pH (5,0 à 6,5), la température (40°C à 70°C) et la concentration en chlorure de sodium (1% à 5%), ainsi que les conditions de formation des spores, sont homogènes et en accord avec les descriptions antérieures de l'espèce. La résistance thermique des spores obtenues en conditions standardisées montre plus d'hétérogénéité selon la souche : la durée de réduction permettant

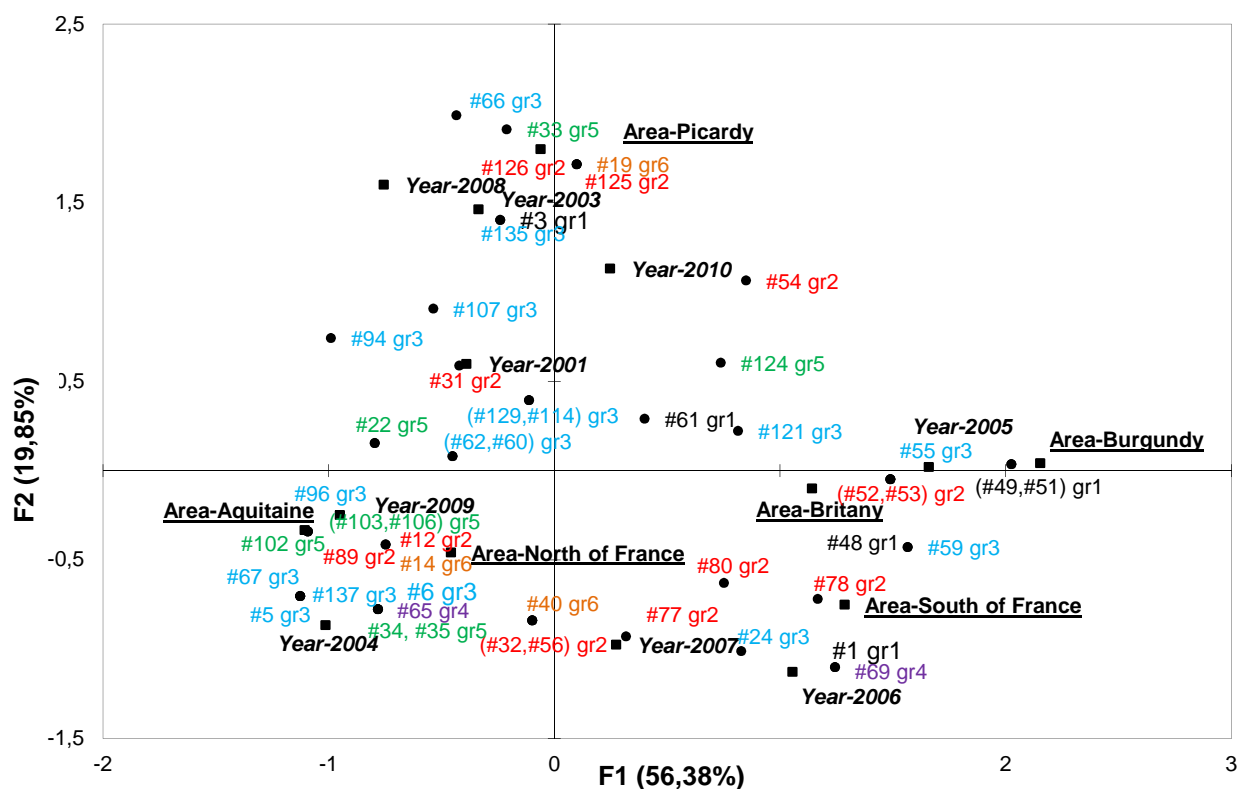
d'inactiver 5 log de population à 120°C varie entre moins de 0,5 min pour trois souches et jusqu'à plus de 10 min pour quatre autres (**Figure 1**).



**Figure 1 : Exemple de courbe de destruction thermique obtenues avec les spores de *G. stearothermophilus***

Les courbes (A) et (B) ont été obtenues avec les spores de la souche #103 et #67 respectivement.

Aucune relation entre le groupe génétique et l'origine géographique, temporelle ou liée aux caractéristiques de l'aliment, n'a pu être mise en évidence par analyse des correspondances multiples ni même entre le groupe génétique et les caractéristiques physiologiques (**Figure 2**).



**Figure 2 : Analyse en composante multiple réalisée avec des souches de *G. stearothermophilus* isolées de conserves de légumes altérées**

Les variables sont l'année d'isolement de la souche et l'emplacement géographique de la culture de légumes. Les observations sont le numéro et le groupe M13de de la souche. Chaque couleur correspond à un groupe différent.

De façon remarquable, les souches dont les spores sont les plus résistantes ont aussi la capacité à se développer à la température la plus basse (40°C), au pH le plus bas (pH 5), ou à la concentration en sel de 3%.

Les résultats de ces travaux sont développés dans le chapitre suivant sous forme d'un manuscrit qui a été accepté à « Food Microbiology » (Ms. Ref. No.: FM-D-13-00625).

## 2. Article 1: Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*

Loïc DURAND, Stella PLANCHON, Marie-Hélène GUINEBRETIERE, Frédéric CARLIN, Fabienne REMIZE

Manuscrit accepté dans la revue Food Microbiology

### 2.1 Abstract

---

*Geobacillus stearothermophilus* is the main thermophilic spore former involved in flat sour spoilage of canned foods. Three typing methods were tested and applied to differentiate strains at intra-species level: *panC* sequence analysis, REP-PCR and M13-PCR. *panC* gene was highly conserved within the studied strains, suggesting a low intra-specific diversity. This was supported by REP-PCR primary assays and M13-PCR results. M13-PCR profile analysis succeeded in differentiating six closely related groups (at 79% threshold similarity) among 127 strains from a range of spoiled canned food products and from different canneries. Phenotypic traits were investigated among 20 selected strains representing groups and origins. Ranges of growth under different temperatures (from 40°C to 70°C), pH (from 5.0 to 6.5), NaCl concentrations (from 1 to 5%) and sporulation conditions poorly differed between strains, but wet heat resistance of spores showed a 20-fold variation between strains. Furthermore, in this study, strains that belonged to the same M13-PCR genetic group did not share phenotypic characteristics or common origin. The work emphasizes a low diversity within the *G. stearothermophilus* species but data from this study may contribute to a better control of *G. stearothermophilus* spoilage in canned food.

---

### Highlights

- 127 *G. stearothermophilus* strains of diverse origins were examined for diversity
- M13-PCR typing showed a weak genetic diversity
- Growth limits for temperature, pH and NaCl poorly differed between strains.
- Time to 5 log-reduction varied between < 0.5 min and 12.4 min

### Keywords

*G. stearothermophilus*, canned food spoilage, spore-forming bacteria, diversity, M13 genetic typing

## 2.2 Introduction

*Geobacillus stearothermophilus* is a thermophilic spore-forming bacterium with optimal growth between 55°C and 65°C (Nazina et al., 2001). *G. stearothermophilus* properties interest several industrial sectors, as a source of enzymes with high temperature stability, producer of antiviral compounds, biological indicator for sterility control, and as a major cause of food spoilage (Cheng et al., 2009; Guizelini et al., 2012; Rivero et al., 2012). *G. stearothermophilus* is responsible for “flat-sour” spoilage of low-acid canned food stored at high temperature (above 40°C) (Ashton and Bernard, 1992). “Flat sour” results from saccharide fermentation into organic acids without gas production (Kalogridou-Vassiliadou, 1992). *G. stearothermophilus* spores can withstand canned food heat treatment and can further germinate and grow in products. *G. stearothermophilus* is responsible for ca. 35% of canned food spoilage during incubation at 55°C (Ashton and Bernard, 1992; André et al., 2013). It has been detected in many raw and processed foods (canned vegetables, ready-to-eat meals containing meat, fruit preparations, dehydrated ingredients, gelatin extracts...) (Postollec et al., 2012) and in processing facilities. For instance up to 50% milk powders may contain the bacterium, which may represent more than 10% of thermophilic isolates (Rückert et al., 2004) and *G. stearothermophilus* spores were detected in 8.6% and 2.1% of raw carrots and green bean samples, respectively (Sevenier et al., 2012).

High prevalence in food has supported the characterization of *G. stearothermophilus* isolates for survival and growth in canned food, without clear evidence of the variability within the species (Donk, 1920; Gordon and Smith, 1949; Smith and Gordon, 1957; Gibson and Gordon, 1974; Kalogridou-Vassiliadou, 1992; White et al., 1993; Nazina et al., 2001; Coorevits et al., 2012). Genomic studies are now increasingly carried out on thermophilic bacteria to determine the extent of variability and diversity within bacterial groups or species. Several strategies and methods can be used. For instance these include rep-PCR profiling and 16S rRNA coding region sequencing applied on thermophilic bacteria from hot springs (Adiguzel et al., 2009), RAPD-PCR or MLVA applied to differentiate thermophilic bacilli in milk powder and tracking of contamination in dairy processing plants (Ronimus et al., 2003; Rückert et al., 2004). Sequencing methods that target highly conserved housekeeping genes such as *recN*, *rpoB* and *recA* have been applied to the *Geobacillus* genus (Zeigler, 2005; Meintanis et al., 2008; Weng et al., 2009; Seale et al., 2012). The diversity of the pathogenic and spore-forming bacterium *Bacillus cereus* was also investigated with success using a M13 sequence-based polymerase chain reaction (M13-PCR) (Guinebretiere and Nguyen-The,

2003), *panC* sequencing and AFLP (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003; Guinebretiere *et al.*, 2008). Analysis of 16S rRNA gene sequence was not discriminatory enough for *G. stearothermophilus* (Dinsdale *et al.*, 2011). In this case, *panC* gene phylogeny could be used as an alternative to 16S rRNA gene phylogeny, as with *B. cereus* (Guinebretiere *et al.*, 2008). Sequence (or partial sequence) of the coliphage M13 is repeated on many genomes and was exploited as primer in DNA sequence based PCR (M13-PCR) (Henderson *et al.*, 1994; Guinebretiere and Nguyen-The, 2003). This resulted in a more rapid DNA fingerprinting technique that discriminates bacterial isolates at the intra-specific level, and potentially up to the strain level. As for RAPD and REP-PCR, M13-PCR is less cumbersome and time-consuming than other typing methods such as genotyping, ribotyping, RFLP, PCR-RFLP and AFLP, and is adapted to studies on a large number of strains (i.e. > 100). In addition, M13-PCR involves a longer primer and higher hybridization temperatures than RAPD and thus results in more reproducible results.

The aims of this work were (i) to compare the ability of three typing methods (M13-PCR, REP-PCR and *panC* sequencing) to differentiate *G. stearothermophilus* genetic groups, (ii) to evaluate the genetic diversity among a large panel of *G. stearothermophilus* strains from spoiled canned food, and (iii) to explore their phenotype in relation to ability to grow at different temperatures, pH and salt concentrations, ability to sporulate, and spore resistance to heat treatment.

## 2.3 Materials and methods

### 2.3.1 Strains and culture conditions

A total of 127 *G. stearothermophilus* strains were tested (Supplementary Table S1). Among those, 116 strains were recovered between 2001 and 2010 from spoiled canned food after long-term storage at 55°C (André *et al.*, 2013). Two isolates (#110 and #112) were isolated from vegetable debris sampled in a cannery blancher. Three isolates (#82, #85 and #86) were isolated from the covering brine of canned vegetable, and one isolate, #63, was isolated from a cannery conveyor surface. They were identified as *G. stearothermophilus* using either a specifically developed PCR tool (SporeTraQ™) (Prevost *et al.*, 2010) that targets the DNA region corresponding to rRNA internal transcribed sequence 16S-23S, or a partial sequencing of 16S rRNA coding region. Five other *G. stearothermophilus* strains were obtained from the DSMZ collection (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany). DSM 22 and DSM 297 were isolated from spoiled canned food. The origin of DSM 5934, DSM 2313 and DSM 6790 strains is not specified.



Strains were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in a cryogenic preservative solution with beads (AES Chemunex, Bruz, France).

A bead of a stock culture was dropped into brain heart infusion (BHI) before incubation for 48 h at  $55^{\circ}\text{C}$ . A 500  $\mu\text{l}$  volume of this pre-culture was inoculated into BHI and incubated overnight at  $55^{\circ}\text{C}$ . The resulting culture was used for subsequent inoculation of growth and sporulation media.

### 2.3.2 Genetic group and diversity

#### • DNA extraction

A 100  $\mu\text{l}$  volume of an overnight culture in BHI was spread on dextrose tryptone agar (DTA) and incubated for 16 h at  $55^{\circ}\text{C}$  before DNA extraction. DNA preparation was obtained as described previously (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003) with minor modifications. Two loops of cells were suspended in 550  $\mu\text{l}$  extraction buffer (1.7% sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA, 200 mM NaCl). The suspension was incubated at  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 min with 25  $\mu\text{l}$  of proteinase K ( $10 \mu\text{g} \mu\text{l}^{-1}$ ) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). DNA was extracted with one volume of phenol. After centrifuging, the aqueous phase containing DNA was mixed with one volume of phenol, recovered after centrifuging, and then mixed with one volume of chloroform. The aqueous phase was precipitated with cold absolute ethanol. After centrifuging, the pellet was washed with cold 70% ethanol, air dried at room temperature, dissolved in 50  $\mu\text{l}$  sterile Milli-Q water, and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . DNA was quantified by absorbance at 260 nm (NanoQuant Plate™ Infinite® M200, Tecan Austria). The DNA was extracted from three independent cultures of randomly selected 24 strains to evaluate the reproducibility of genomic analyses.

#### • M13-PCR

The method used followed the PCR protocol as previously described with minor modifications (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003). PCR mixture (25  $\mu\text{l}$ ) contained 50 ng of DNA template, 4.8 mM primer PM13: 5'-GAGGGTGGCGGCTCT-3' (Eurogentec S.A., Seraing, Belgium), 1.25 mM dNTPs mix (Eurogentec), 6 mM  $\text{MgCl}_2$  (Sigma-Aldrich), 10% (vol/vol) dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich), and 1.5 U of Diamond *Taq*® DNA polymerase (Eurogentec) in supplier buffer. PCR amplifications were performed in a GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). PCR cycling parameters included a denaturation

step at 94°C for 3 min followed by 35 cycles each consisting of 94°C for 1 min, 40°C for 1 min and 68°C for 8 min; and a final extension step at 68°C for 16 min. A negative control containing Milli-Q water instead of DNA and a positive control with the DNA of *B. cereus* strain ATCC 14579 producing a known banding pattern were included in each PCR experiment. All of the DNA preparations were analyzed by M13-PCR twice independently to evaluate the reproducibility of the typing results.

- ***REP-PCR analysis***

A set of 24 strains underwent REP-PCR genomic fingerprinting as previously described (Versalovic et al., 1994). Amplification was performed as described above, except that 2.4 µM of each primer REP 1R-I (5' III IGC ICG ICG ICA TCI GGC 3') and REP 2-I (5' ICG ICT TAT CIG GCC TAC 3') (Eurogentec) was used, and PCR elongation was performed at 65°C.

- ***panC sequencing***

The oligonucleotides used for the PCR amplification of *panC* encoding pantoate-β-alanine ligase were: PCF3, 5'-TCGGDTTYGTNCCGACGATGG-3' and PCR1, 5'-AAABCGVACGGCVACVGCGA-3'. They were designed from sequence alignment of *panC* genes from several *Geobacillus* sp. (accession numbers: CP001794, CP002442, CP002050, CP001638, CP002293, NC\_006510, and CP003125). Amplification reaction was performed in a final volume of 25 µl containing DNA template (50 ng), dNTPs mix (Eurogentec) (0.2 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), primers (0.4 µM each), and 0.5 U of Diamond *Taq*<sup>®</sup> DNA polymerase (Eurogentec) in supplier buffer. The cycling program was 94°C for 4 min; 35 cycles of 94°C for 40 s, 64°C for 40 s and 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 10 min. PCR product was purified with the High Pure PCR Product Purification Kit according to the manufacturer's instructions (Roche, France). The partial sequencing of the *panC* gene (648 pb) was done with the PCF3 primer by Eurofins MWG Operon (Courtaboeuf, France) according to the classical Sanger method. The 20 *panC* sequences were registered in GenBank under accession numbers KF177233 to KF177252. Sequence alignment was carried out with Clustal Omega at EBI-EMBL (Goujon et al., 2010; Sievers et al., 2011). Percentages of identity were calculated between these sequences and other thermophilic spore-forming bacteria *panC* sequences (accession numbers: NC\_006274, NC\_004722, NC\_003909, NC\_006510 and CP000232) available in the GenBank database.

- ***Electrophoresis and data analysis***

PCR products from M13-PCR and REP-PCR were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels with the molecular mass DNA marker Smart Ladder (Eurogentec) using 0.5× TAE buffer (20 mM Tris, 10 mM acetic acid, 0.5 mM EDTA, pH 8). Gels were stained with ethidium bromide and visualized and photographed on a UV gel imager (Molecular Imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>™</sup> XR System 170-8170, BioRad, France). Band position, similarity coefficient and dendrogram were determined using the BioGene 99.04 software (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France). A dendrogram was constructed from the similarity banding pattern of M13-PCR amplification using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). Positive control *B. cereus* ATCC 14579 strain was chosen to evaluate the variability generated by the analyses (PCR-electrophoresis-image analysis). Amplification product from the positive control was deposited on each gel, and results were compared to define the confidence interval.

### 2.3.3 Growth studies

- ***Growth at different temperatures and pH***

Growth at a range of temperature and pH was tested on dextrose tryptone agar (DTA) and in DT broth (DTB) selected for its color stability at high temperature that favors reading. Inoculums were made of an overnight culture in BHI broth diluted 100-fold in peptone salt water to obtain suspensions at  $10^5$  CFU.ml<sup>-1</sup>. In a first step one a droplet (10 µl) of each bacterial suspension was deposited on DTA. Plates were wrapped in aluminum foil to avoid desiccation and incubated for 14 days. Growth was tested at each of the 24 combinations of incubation temperature (45°C, 50°C, 55°C or 70°C) and pH (6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.8 and 4.5). Growth at 40°C was tested only on DTA pH 6.5. The pH adjustment was performed in sterilized molten DTA by addition of filter-sterile 2N HCl (Fischer Scientific SAS, Illkirch, France). Strains were deemed positive for growth when the diameter of the colony formed from the droplet inoculum at the agar surface was greater than 1 mm. Colony development was examined daily after 48 h of incubation, until 14 days.

In a second step strains that were negative in at least one combination of pH and temperature were tested in (DTB) to differentiate between absence of growth and weak growth. A 500 µl volume of an overnight culture was inoculated in DTB sterilized at 121.1°C for 15 min and incubated at 45°C, 50°C, 55°C and 70°C, adjusted to the required pH with filter-sterile 2N HCl for a maximum of 14 days. Growth was controlled every 24 h by serial decimal dilution

of the culture onto DTA and colony enumeration after 48 h incubation at 55°C. Strains were deemed positive when they showed at least one 1 log cfu.ml<sup>-1</sup> increase in DTB after 14 days of incubation. Growth at 37°C, 39°C, 40°C, 72°C and 75°C at pH 6.5 was tested in DTB during incubation for 14 days using the same enumeration procedure and was replicated three times with independently prepared inoculums. Incubation temperatures at 37°C, 39°C, 40°C, 72°C and 75°C were obtained in a thermo-stated water-bath and temperature was monitored using a digital thermometer (EcoScan Temp5, Fisher, Illkirch, France).

• ***Growth at different sodium chloride concentrations***

DTA was supplemented with sodium chloride to obtain final concentrations in the range 1–5% (wt/vol). The previously described drop method was used to inoculate the medium. Water activity ( $a_w$ ) DTA was measured for each NaCl concentration (AquaLab, Biotrace International SAS). Incubation was performed at 55°C for a maximum of 14 days. Strains were deemed positive for growth, as colony diameter at the agar surface was greater than 1 mm.

2.3.4 *Spore production and evaluation of spore heat resistance*

• ***Spore production and percentage of sporulation***

For spore production, a 2 ml volume of an overnight culture in BHI was spread onto the sporulation medium (SM) on a 145 mm agar plate. The sporulation medium was made of 10 g.l<sup>-1</sup> meat extract, 2 g.l<sup>-1</sup> yeast extract, 0.04 g.l<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O and 15 g.l<sup>-1</sup> agar. Temperatures tested for sporulation were 40, 45, 55 and 70°C. The spores were also examined under a phase-contrast microscope under a ×1000 magnification to estimate the % of sporulation as the % of phase bright and free spores within the sporulating population after 21 days of incubation at selected temperature and pH. Approximately 30 to 50 cells were counted in 10 observation fields for each different strain. Spores were harvested when the culture contained more than 50% of free spores. Harvested spores were washed with 5 ml of sterile distilled water, pelleted at 1400 × g for 20 min at 4°C, and suspended again in 5 ml of sterile distilled water. This procedure was replicated four times. Residual vegetative cells and germinated spores were killed by heating suspensions at 100°C for 10 min. Spore suspensions were stored for 15 days at 4°C. These spore suspensions were heated at 100°C for 10 min for counting. One batch of spores was prepared for each strain.

• *Spore heat resistance and curve fitting with mathematical models*

Heat resistance at 120°C was determined as previously described (André et al., 2013). The number of surviving spores in capillary tubes was evaluated after 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6 and 8 min. Serial decimal dilutions of the content of capillary tubes in 0.2 M phosphate buffer were spread onto bromocresol purple (BCP), and then covered with layer of molten BCP at 50°C. Plates were incubated at 55°C for 2 days before colony counts. The time for a 5-log<sub>10</sub> reduction ( $t_{5D}$ ) was used to compare the heat resistance of isolates, to take into account the different forms of survival curves (linear, concave or convex) and to account for a large number of log-reduction. Graphical log plots of surviving population vs heating time ( $\log \text{CFU.ml}^{-1} = f(t)$ ) were fitted according to three equation models: log-linear, biphasic log-linear and Weibull.

The log-linear model is based on the following equation:

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D},$$

where  $N_0$  and  $N$  are the initial and final number of cells (CFU.ml<sup>-1</sup>) after a treatment time  $t$  (min), respectively, and  $D$  is the decimal reduction time (min).

The biphasic log-linear model was applied with the following equation:

$$\log N = \begin{cases} \log N_0 & \text{if } t \leq \text{lag} \\ \log N_0 - \frac{t}{D} & \text{if } t > \text{lag} \end{cases},$$

where  $N_0$  and  $N$  are the initial and final number of cells (CFU.ml<sup>-1</sup>) after a treatment time  $t$  (min), respectively,  $D$  is the decimal reduction time (min), and lag the duration of the latency phase.

The Weibull model (Couvert et al., 2005) was applied with the equation:

$$\log N = \log N_0 - \left( \frac{t}{\delta} \right)^p,$$

where  $N_0$  and  $N$  are the initial and final number of cells (CFU.ml<sup>-1</sup>) after a treatment time  $t$  (min), respectively,  $\delta$  is the first reduction decimal time (min) that leads to a 10-fold reduction in surviving population, and  $p$  is the fitting parameter. The equation that generates the lowest sum of squared deviation (SSD) was used to calculate the time for a 5-log<sub>10</sub> reduction ( $t_{5D}$ ). This parameter was used to compare heat resistance of isolates.

### 2.3.5 Statistical analysis

Qualitative data of the tested variable were analyzed by multiple correspondence analysis (MCA) with the software XLSTAT (Addinsoft<sup>TM</sup>, Paris, France). The variables tested were either (i) food category/product for isolation, food company, geographical location and year of isolation, or (ii) lowest temperature, highest temperature, lowest pH, highest pH and highest NaCl concentration at which a growth was observed. Observations were isolate numbers and M13-PCR group numbers.

## 2.4 Results and discussion

### 2.4.1 Genetic diversity of *G. stearothermophilus* strains examined with M13-PCR, REP-PCR and *panC* sequencing

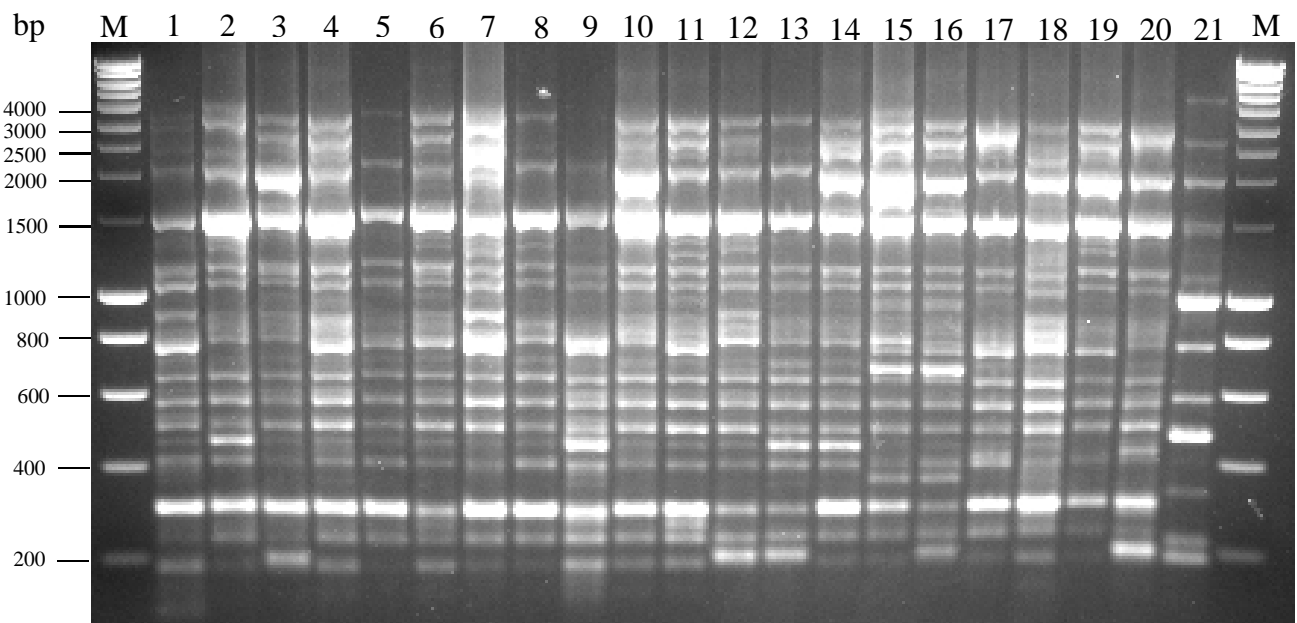
An ideal genotyping method should be applicable to all isolates, capable of differentiating unrelated isolates, reproducible both within and between laboratories, rapid, cost-effective, and easy to perform. In this study, M13-PCR, REP-PCR and *panC* sequencing were applied within the species *G. stearothermophilus*. All three techniques had previously been used successfully for species typing in the genus *Bacillus* (Guinebretiere *et al.*, 2001; Guinebretiere and Nguyen-The, 2003; Guinebretiere *et al.*, 2008).

An internal region of *panC* gene was sequenced for 20 selected strains. A 82.7% sequence identity was obtained with *G. kaustophilus* HTA426 *panC* gene, validating identity of sequences obtained with that method. When compared with the reference *G. stearothermophilus* DSM 22, sequence identity of obtained sequences ranged from 99.4% to 100%. These results indicate that *panC* gene is probably highly conserved within the *G. stearothermophilus* species. We thus expect a low diversity in this species. For this reason *panC* sequence could not be used as a phylogenetic tool for *G. stearothermophilus* strains isolated from canned food spoilage. The low intra-specific diversity in *G. stearothermophilus* species is also underlined by numerous bibliographic data : the *rpoB* housekeeping gene exhibited more than 74% of identity within *Geobacillus* spp. (Meintanis *et al.*, 2008); *recA* and *rpoB* gene sequence comparison discriminates only among *Geobacillus* species (Weng *et al.*, 2009); *recN* is a powerful tool to differentiate species of *Geobacillus* but failed to differentiate strains at intraspecific level (Zeigler, 2003);.. Also, the use of the sequence 16S-23S rRNA internal transcribed spacers (ITS) have shown no phylogenetic relationships between the different species of *Geobacillus* (Xu and Côté, 2003; Kuisienè *et al.*, 2008),

which decrease the interest of use it. All these bibliographic data together with *panC* sequence analysis from this study converge to a low intra-specific diversity in *G. stearothermophilus*.

A series of naturally-occurring repetitive DNA sequences are dispersed in multiple copies throughout bacterial genomes (Gilson *et al.*, 1984; Stern *et al.*, 1984; Hulton *et al.*, 1991; Lupski and Weinstock, 1992; Koeuth *et al.*, 1995). Although the functions of these interspersed repetitive DNA elements remain unknown, their presence is useful for DNA fingerprinting of bacteria. REP-PCR was successfully used by Meintanis *et al.* (2010) to discriminate *Geobacillus* and *Bacillus* species type strains. In this study, the REP-PCR method was performed on 24 isolates that differed by their isolation origin. A maximum of three to five bands only was observed on the banding patterns, and most of strains exhibited similar electrophoretic profiles, which was not sufficient to efficiently discriminate the isolates (data not shown). In contrast to M13-PCR, the REP-PCR technique resulted in a low number of signals on the banding patterns. Hence REP-PCR was not kept to characterize more specifically *G. stearothermophilus* isolates.

Another method that uses a DNA sequence repeated within genomes is M13-PCR. An example of fingerprints generated using M13-PCR on DNA extracted from 20 isolates out of the 127 *G. stearothermophilus* isolates from this study is shown in **Figure 1**.

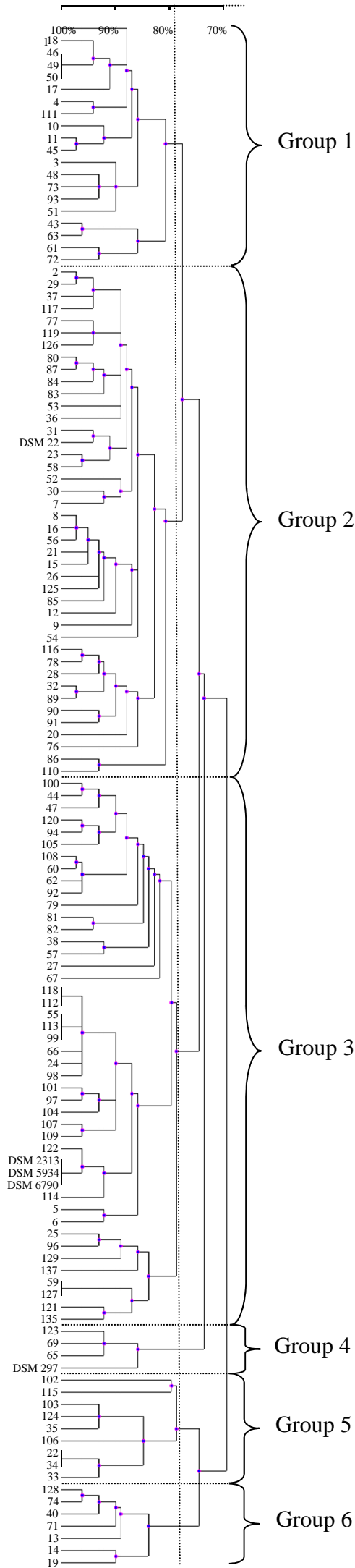


**Figure 1: M13-PCR banding profile of 20 *G. stearothermophilus* strains.**

Lane 1-20: strains #1, #100, #54, #8, #46, #52, #66, #119, #28, #122, DSM 22, #12, #59, #40, #102, #103, #128, #13, #67 and #14. Lane 21: *B. cereus* ATCC 14579 positive control. Lanes M: DNA molecular size marker Smart ladder SL (Eurogentec).

The number of detected DNA bands varied up to 20 and band size ranged between 100 and 5000 bp with a confidence interval of 9%. A M13-PCR profile was obtained for each of the 127 strains. A dendrogram was constructed to compare *G. stearothermophilus* isolates (**Figure 2**). A confidence interval of 9% was obtained from positive controls from three independent DNA preparations, each assayed in triplicate by independent PCR, electrophoresis and electrophoretic profiles analysis. Six closely related groups among the 127 isolates of *G. stearothermophilus* were obtained at a similarity threshold of 79 %, using Dice's coefficient and UPGMA clustering methods (**Figure 2** and Supplementary **Table S1**). The groups differed by the number of isolates: 84% of strains belonged to the first three groups, named 1 (16 %), 2 (33 %) and 3 (35 %). The other three groups, named 4, 5 and 6, contained four (3%), nine (7%) and seven (6 %) strains respectively. Three DSM collection strains DSM 2313, DSM 5934 and DSM 6790 were found in Group 3. DSM 22 and DSM 297 were respectively in groups 2 and 4. Despite the great differences between origins of strains (geographic area, food product, Food Company and year of isolation, see Supplementary Table S1), the similarity between M13-PCR profiles was high (**Figure 1**, **Figure 2**), reaching more than 75 % similarity for 107 strains (84 % of strains) and more than 69 % for all strains. This emphasized the low intra-specific diversity suggested in *G. stearothermophilus* by the high *panC* sequence identity percent. However, M13-PCR had success in differentiating closely related strains. In particular, some strains exhibited one or two specific bands in their profile that could allow recognizing them. Thus, this may be an important tool to trace *G. stearothermophilus* spoilers on the food processing chain.





**Figure 2: Dendrogram of *G. stearothermophilus* genotypes obtained with the M13-PCR method.** The percentage similarities were calculated using Dice's coefficient and UPGMA clustering methods. The groups were formed with a similarity level at 79% (represented by a vertical scale).

#### 2.4.2 Growth of selected *G. stearothermophilus* strains at a range of temperature, pH and NaCl concentrations and rates of sporulation

Several strains were chosen on the basis of their different origin and their different genetic profile (groups 1, 2, 3, 5 and 6 in the present work) to estimate the phenotypic diversity among *G. stearothermophilus* strains isolated from canned food. A set of 19 strains that differed by their isolation origin and the type strain DSM22 were tested for their ability to grow at pH between 4.5 and 6.5 and between 37°C and 75°C (**Table 1**). All strains exhibited growth in less than 48 h at 50°C at the three initial pH values of 6.5, 6.0 and 5.5, as well as at 55°C and 70°C, but only for initial pH values of 6.5 and 6.0. At an initial pH value of 5.0, only six strains grew at 50°C, only three at 55°C, and none at 70°C. No strain was able to grow at pH 4.8 and below at 50°C within 14 days. The most low-pH-tolerant strains were isolate #122 and the type strain DSM22. At the most favorable initial pH of 6.5, growth was undetected for all strains at 72°C, and 75°C. At this pH, the lowest temperature that allowed growth for 12 isolates was 40°C. Strains #28 and #67 grew in 48 h at 40°C. None of the 20 tested strains was able to grow at 39°C and 37°C. At pH 5.5, growth ability at 70°C differed according to the strain: only strains #28, #46, #102, #103 and #128 grew, and that growth was observed within 48 h. Interestingly, isolate #28 exhibited a rapid growth at 40°C pH 6.5, at 70°C pH 6.5 and at 50°C pH 5. Conversely, temperature and pH ranges of growth were restricted for isolate #119.

**Table 1. Growth of *G. stearothermophilus* strains at different initial pH and temperatures.**

| Strain number | Time to growth at indicated pH and temperature (°C) <sup>a</sup> |    |                 |        |                 |        |    |    |    |        |    |
|---------------|--|----|-----------------|--------|-----------------|--------|----|----|----|--------|----|
|               | pH 6.5   |    |                 | pH 6.0 |                 | pH 5.5 |    |    |    | pH 5.0 |    |
|               | 40   | 45 | 50              | 45     | 50              | 45     | 50 | 55 | 70 | 50     | 55 |
| (M13 group)   |  |    | 55              |        | 55              |        |    |    |    |        |    |
|               |  |    | 70 <sup>b</sup> |        | 70 <sup>b</sup> |        |    |    |    |        |    |
| #1 (1)        | >4   | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | ng | ng     | ng |
| #46 (1)       | ng   | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | 2  | ng     | ng |
| #8 (2)        | ng   | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 4  | ng | ng     | ng |
| #12 (2)       | >4   | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | ng | ng     | ng |
| #28 (2)       | 2  | 2  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | 2  | 4      | 4  |
| #52 (2)       | 4  | 4  | 2               | 4      | 2               | 4      | 2  | 3  | ng | 3      | ng |
| #54 (2)       | 4  | 4  | 2               | 4      | 2               | 4      | 2  | 3  | ng | ng     | ng |
| #119 (2)      | ng   | ng | 2               | ng     | 2               | ng     | 2  | 3  | ng | ng     | ng |
| DSM 22 (2)    | 4  | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | ng | 2      | 4  |
| #59 (3)       | ng   | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 4  | ng | ng     | ng |
| #66 (3)       | 4  | 4  | 2               | 4      | 2               | 4      | 2  | 3  | ng | ng     | ng |
| #67 (3)       | 2  | 2  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | ng | ng     | ng |
| #100 (3)      | 4  | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | ng | ng     | ng |
| #122 (3)      | 4  | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | ng | 2      | 4  |
| #102 (5)      | ng   | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | 2  | ng     | ng |
| #103 (5)      | ng   | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | 2  | ng     | ng |
| #13 (6)       | ng   | 4  | 2               | ng     | 2               | ng     | 2  | 3  | ng | >4     | ng |
| #14 (6)       | 4  | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | ng | ng     | ng |
| #40 (6)       | ng   | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | ng | ng | >4     | ng |
| #128 (6)      | 4  | 4  | 2               | 4      | 2               | ng     | 2  | 3  | 2  | ng     | ng |

<sup>a</sup>2, growth after 2 days incubation; 3, growth after 3 days incubation; 4, growth after 4 days incubation; >4, growth after more than 4 days incubation; ng, no growth observed for 14 days; nt, not tested ; <sup>b</sup> Same results were obtained for the temperatures 50, 55 and 70°C

Growth in the presence of NaCl was assayed for the same strains in a concentration range of 1–5% (**Table 2**). The results showed that all strains grew at 1% and 2%, but only 12 and three strains (#40, #100 and #102) were able to develop at 3% and 4% NaCl respectively.

**Table 2. Growth of *G. stearothermophilus* strains incubated at different NaCl concentrations**

| Strain number<br>(M13-group) | Time to growth (days) at NaCl<br>concentrations (wt/vol) ( $a_w$ ) |               |               |               |
|------------------------------|--|---------------|---------------|---------------|
|                              | 1%<br>(0.975)  | 2%<br>(0.973) | 3%<br>(0.971) | 4%<br>(0.966) |
| #1 (1)                       | 2  | 2             | 3             | ng            |
| #46 (1)                      | 2  | 2             | ng            | ng            |
| #8 (2)                       | 2  | 2             | ng            | ng            |
| #12 (2)                      | 2  | 2             | ng            | ng            |
| #28 (2)                      | 2  | 2             | 2             | ng            |
| #52 (2)                      | 2  | 2             | 2             | ng            |
| #54 (2)                      | 2  | 2             | 2             | ng            |
| #119 (2)                     | 2  | 3             | ng            | ng            |
| DSM 22 (2)                   | 2  | 2             | 2             | ng            |
| #59 (3)                      | 2  | 2             | 3             | ng            |
| #66 (3)                      | 2  | 2             | ng            | ng            |
| #67 (3)                      | 2  | 2             | 3             | ng            |
| #100 (3)                     | 2  | 2             | 2             | 3             |
| #122 (3)                     | 2  | 2             | 2             | ng            |
| #102 (5)                     | 2  | 2             | 3             | 3             |
| #103 (5)                     | 2  | 2             | ng            | ng            |
| #13 (6)                      | 2  | 2             | ng            | ng            |
| #14 (6)                      | 2  | 2             | 2             | ng            |
| #40 (6)                      | 2  | 2             | 2             | 3             |
| #128 (6)                     | 2  | 2             | ng            | ng            |

ng, no growth observed

All strains grew at 50°C and 55°C and pH 6.0 and 6.5, including in the presence of 2% NaCl. Many of our observations are in accordance with characters reported in the taxonomic revision of the genus *Geobacillus* (Ronimus *et al.*, 2003; Coorevits *et al.*, 2012): maximal temperature for growth not exceeding 70°C, variable minimal temperature for growth in the range 30°C to 45°C and no growth at 5% NaCl. In these studies, most of the strains can grow between 40°C and 60°C. In our study, growth temperature and pH range suitable for growth were close for all strains whatever their origin, although some differences could be noted. By contrast, strains of *B. cereus* have distinct growth characteristics depending on their genetic groups (Guinebretiere *et al.*, 2008). It has been shown that *B. cereus* strains phenotypic traits are related according to their toxicity, but not according to their origin (Carlin *et al.*, 2006).

The percentage of spores produced as a function of initial pH and incubation temperature was determined for the same 20 strains (**Table 3**). The most efficient condition for spore production was pH 7.0 and 55°C for all strains except for three isolates (#8, #28 and #128), which formed more spores at 45°C, and isolate #12, which formed more spores at pH 6.0. Only isolate #52 produced 85% of spores at 70°C, whereas all the others produced less than 35% or none.

#### 2.4.3 Heat-resistance of selected *G. stearothermophilus* strains

Survival curves were followed on 3.5 to > 6 log reduction. A satisfactory fitting was obtained with at least one of the survival models, as shown by low RSS (**Table 4**) and by visual examination of graphs (data not shown). The  $t_{5D}$  value (time necessary to inactivate 5-log of population) at 120°C was used to compare heat-resistance of spores produced at pH 7.0 and 55°C (Table 4). Strains #28, #52, #67 and DSM 22 exhibited a  $t_{5D}$  value above 10 min. The  $t_{5D}$  values were between 6.4 and 8.9 min for seven strains and below 4.9 min for six strains. The lowest  $t_{5D}$  value, 1.9 min, was obtained for isolate #119. Lastly, strains #8, #14 and #46 exhibited log-reduction greater than 7.0 in 0.5 min and  $t_{5D}$  was arbitrarily set at < 0.5 min. The spore wet heat-resistance differed significantly between strains (no overlap in the 95% confidence intervals of many strains). These data were compared to those recorded in a meta-analysis of *G. stearothermophilus* heat-resistance parameters (Rigaux *et al.*, 2013). At 120°C and pH 6.5 to 7.0, D values range between 1.3 min and 16.7 min with a median at 3.0 min, which gives  $t_{5d}$  between 6.5 min and 84 min, with a median at 15.0. The  $t_{5d}$  values reported in this work, although not all based on log-linear reduction, are clearly in the lower range of these previous observations.

**Table 3. Sporulation of *G. stearothermophilus* strains from different genotypic groups**

| Strain number<br>(M13 group) | % of sporulation after incubation at different temperature (°C) and<br>pH conditions <sup>a</sup> |        |        |        |        |        |        |
|------------------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                              | 40°C  |        | 45°C   |        | 55°C   |        | 70°C   |
|                              | pH 7.0  | pH 7.0 | pH 7.0 | pH 6.0 | pH 5.5 | pH 5.0 | pH 7.0 |
| #1 (1)                       | 2   | 7      | 100    | 90     | 80     | nt     | 12     |
| #46 (1)                      | nt  | 0      | 100    | 95     | 95     | nt     | 5      |
| #8 (2)                       | nt  | 90     | 45     | 2      | 30     | nt     | 0      |
| #12 (2)                      | 0   | 0      | 70     | 95     | 10     | nt     | 0      |
| #28 (2)                      | 0   | 95     | 50     | 20     | 50     | 1      | 1      |
| #52 (2)                      | 1   | 20     | 90     | 72     | 15     | nt     | 80     |
| #54 (2)                      | 0   | 80     | 80     | 10     | 10     | nt     | 35     |
| #119 (2)                     | nt  | nt     | 80     | 70     | 40     | nt     | 0      |
| DSM 22 (2)                   | 0   | 5      | 95     | 60     | nt     | 0      | 0      |
| #59 (3)                      | nt  | 0      | 70     | 60     | 15     | nt     | 0      |
| #66 (3)                      | 4   | 95     | 95     | 95     | 90     | nt     | 0      |
| #67 (3)                      | 0   | 90     | 99     | 80     | 10     | nt     | 1      |
| #100 (3)                     | 0   | 0      | 70     | 60     | 65     | nt     | 0      |
| #122 (3)                     | 7   | 30     | 75     | 70     | 60     | 60     | 0      |
| #102 (5)                     | nt  | 23     | 90     | 80     | 20     | nt     | 0      |
| #103 (5)                     | nt  | 2      | 40     | 10     | 2      | nt     | 5      |
| #13 (6)                      | nt  | 0      | 50     | 45     | 40     | nt     | 0      |
| #14 (6)                      | 7   | 5      | 85     | 15     | 10     | nt     | 0      |
| #40 (6)                      | nt  | 85     | 90     | 60     | nt     | nt     | 0      |
| #128 (6)                     | 0   | 90     | 60     | 10     | 0      | nt     | 2      |

<sup>a</sup> The number is the percentage of spores among total cells formed on sporulation medium after 21 days  
nt, not tested

**Table 4. Heat resistance at 120°C of *G. stearothermophilus* spores produced at 55°C and pH 6.5.**

| Strain number (M13-group) | $t_{5D}$ value (min) | confidence interval | SSI   | log-model* |
|---------------------------|----------------------|---------------------|-------|------------|
| #1 (1)                    | 8.0                  | [7.7 : 8.4]         | 0.147 | biphasic   |
| #46 (1)                   | nd                   |                     |       |            |
| #8 (2)                    | nd                   |                     |       |            |
| #12 (2)                   | 6.6                  | [6.3 : 7.0]         | 0.708 | Weibull    |
| #28 (2)                   | 11.0                 | [10.8 : 11.3]       | 0.011 | biphasic   |
| #52 (2)                   | 12.1                 | [11.5 : 13.1]       | 0.197 | Weibull    |
| #54 (2)                   | 8.1                  | [7.8 : 8.4]         | 0.079 | biphasic   |
| #119 (2)                  | 1.9                  | [1.8 : 2.1]         | 0.032 | Weibull    |
| DSM 22 (2)                | 12.4                 | [11.8 : 13.0]       | 0.234 | linear     |
| #59 (3)                   | 3.6                  | [3.4 : 3.9]         | 1.097 | linear     |
| #66 (3)                   | 7.1                  | [6.7 : 7.6]         | 0.400 | biphasic   |
| #67 (3)                   | 10.7                 | [10.4 : 11.0]       | 0.260 | Weibull    |
| #100 (3)                  | 2.7                  | [2.6 : 2.9]         | 0.141 | linear     |
| #122 (3)                  | 4.9                  | [4.8 : 5.1]         | 0.162 | Weibull    |
| #102 (5)                  | 4.5                  | [4.3 : 4.6]         | 0.269 | Weibull    |
| #103 (5)                  | 3.8                  | [3.7 : 3.8]         | 0.031 | Weibull    |
| #13 (6)                   | 8.9                  | [8.3 : 9.7]         | 0.273 | biphasic   |
| #14 (6)                   | nd                   |                     |       |            |
| #40 (6)                   | 6.4                  | [6.0 : 7.0]         | 0.099 | Weibull    |
| #128 (6)                  | 6.6                  | [6.5 : 6.7]         | 0.006 | biphasic   |

nd: not done ; \*models: linear when destruction was proportional to time, Weibull when a shoulder (characteristic of non-destruction) was observed only at the beginning, and biphasic when curves displayed a linearity with latency

Three out of the four most heat-resistant strains ( $t_{5D} > 10$  min) were able to grow at the lowest temperature (40°C), at the lowest initial pH (pH 5.0) or with 3% NaCl. The fourth strain could grow in the same conditions except at the lowest initial pH. Thus spore heat-resistance was related to the ability to grow under the most extreme temperature and pH values, although the relationship was not reciprocal. This relationship was also observed among emetic *B. cereus* strains. The highest heat-resistance of spores was combined with a shift of growth limits towards high temperature (Warth, 1978).

#### 2.4.4 Relationship between genotypic group and isolate origin or phenotypic diversity

The possible relationship between genotypic group and strain characteristics or strain origin was investigated by multiple correspondence analyses (MCA) on several sets of *G. stearothermophilus* isolates tested in this work.

Several data set were analyzed in each of the three MCA performed: (i) variables “food category”, “food product”, “food company”, “area of isolation”, “year of isolation” and “genotypic group” applied to 127 strains (Supplementary **Table S1**), (ii) variables “vegetable production area”, “isolation year” and “genetic group” applied to 51 isolates from canned vegetables (Supplementary **Table S1**), or (iii) variables “minimal pH of growth”, “maximal pH of growth”, “minimal temperature of growth”, “maximal temperature of growth”, “maximal sodium chloride concentration of growth” and “genetic group” applied to 20 isolates (**Table 1**, **Table 2**). Genetic grouping in each MCA was unrelated to food category or product, year or area of isolation, or food company, or phenotypic features (data not shown).

## 2.5 Conclusions

Regarding the strains tested in our study, the low phenotypic diversity observed may be explained by two hypotheses: either phenotypic diversity is truly weak within the species giving a monomorphic status for *G. stearothermophilus*, or the poor diversity observed is related to the common features shared by most of the strains, *i.e.* spoiled canned food after prolonged storage at 55°C. However the M13-PCR typing should be an efficient tool to trace *G. stearothermophilus* in food processing plant. From a practical point of view, and although recommendations should be modulated by the possible presence of other spore-forming bacteria with higher temperature tolerance such as *Moorella* spp. (André *et al.*, 2013), some process and product conditions regarding *G. stearothermophilus* as a spoilage hazard in the storage of high-temperature canned food can be proposed. For instance, as *G. stearothermophilus* can grow and sporulate at temperatures between 40°C and 70°C, processing line temperatures should be maintained above 70°C. Similarly, salt addition below 3% does not exhibit a significant effect, while pH decrease to 5.0 considerably hinders the growth of most strains. Although an increase in salt concentration cannot be used for organoleptic and nutritional reasons, a decrease in food pH could be investigated, and should result in a lower frequency of long-term canned food spoilage caused by *G. stearothermophilus*. Lastly, heat-treatment process settings could be re-assessed in the light of a 20-fold range of variability for  $t_{5D}$  value at 120°C. Strains #28, #52 and DSM22 were the



most tolerant regarding growth conditions, and exhibited high heat resistance at 120°C: they can be proposed as test strains in canned food processing design.

### **Acknowledgments**

This work forms part of author Loïc Durand's PhD thesis. He received a grant from the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie*, Paris, France. The research work was supported by France AgriMer and by the Conseil Regional Provence-Alpes-Côte d'Azur (DIVERSITHER project). This research work is also a contribution to the activities of the *Unité Mixte Technologique Qualiveg*. Thanks are due to Dr Olivier Couvert (LUBEM, QUIMPER, France) for treatment of heat resistance data.

**Supplementary TableS1: Origin of *G. stearothermophilus* isolates tested in this study and M13-PCR group determined in the present work**

| Isolate number (#) | Food product                    | Food category          | Food company | Area of isolation | Year of isolation | M13-PCR group |
|--------------------|---------------------------------|------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 1                  | Ratatouille                     | Vegetable              | -            | South of France   | 2006              | 1             |
| 3                  | Vegetable mix                   | Vegetable              | B            | Picardy           | 2001              | 1             |
| 4                  | Red bean                        | Vegetable              | L            | North of France   | 2002              | 1             |
| 10                 | Vegetable ravioli               | Vegetable/Starchy food | B            | Picardy           | 2006              | 1             |
| 11                 | Salmon dumpling                 | Fish/Starchy food      | X            | Burgundy          | 2009              | 1             |
| 17                 | Snail                           | Meat                   | Q            | South of France   | 2009              | 1             |
| 18                 | Meatball                        | Meat                   | -            | South of France   | 2010              | 1             |
| 43                 | Beetroot                        | Vegetable              | -            | Center of France  | 2003              | 1             |
| 45                 | Rice pudding                    | Milk/Starchy food      | J            | Aquitaine         | 2008              | 1             |
| 46                 | Fish pie                        | Fish                   | -            | Brittany          | 2007              | 1             |
| 48                 | Salad                           | Vegetable              | V            | South of France   | 2005              | 1             |
| 49                 | Zucchini flan                   | Vegetable/Milk         | -            | Burgundy          | 2005              | 1             |
| 50                 | Zucchini flan                   | Vegetable/Milk         | -            | Burgundy          | 2005              | 1             |
| 51                 | Green bean                      | Vegetable              | O            | Burgundy          | 2005              | 1             |
| 61                 | Sweet pea                       | Vegetable              | K            | Brittany          | 2001              | 1             |
| 63                 | Sample surface                  |                        | F            | Alsace            | 2002              | 1             |
| 72                 | Pork <i>cassoulet</i>           | Vegetable/Meat         | -            | Center of France  | 2006              | 1             |
| 73                 | Sweet corn                      | Vegetable              | -            | Aquitaine         | 2006              | 1             |
| 93                 | Vegetable ravioli               | Vegetable/Starchy food | B            | South of France   | 2006              | 1             |
| 111                | Cream                           | Milk/Starchy food      | -            | Brittany          | 2009              | 1             |
| 2                  | <i>Cassoulet</i>                | Vegetable/Meat         | M            | Center of France  | 2001              | 2             |
| 7                  | Dumpling                        | Meat/Starchy food      | T            | Burgundy          | 2005              | 2             |
| 8                  | Fish dumpling                   | Fish/Starchy food      | X            | Burgundy          | 2007              | 2             |
| 9                  | Zucchini pie                    | Vegetable/Starchy food | -            | South of France   | 2006              | 2             |
| 12                 | White beans cooked in goose fat | Vegetable              | L            | North of France   | 2009              | 2             |
| 15                 | Duck leg                        | Meat                   | -            | South of France   | 2009              | 2             |
| 16                 | Turkey with curry sauce         | Meat                   | Y            | South of France   | 2004              | 2             |
| 20                 | Ham with fat liver              | Meat                   | C            | South of France   | 2010              | 2             |
| 21                 | Dietary cream dessert           | Milk/Starchy food      | -            | Brittany          | 2010              | 2             |
| 23                 | Turkey and vegetable            | Vegetable/Meat         | -            | South of France   | 2001              | 2             |
| 26                 | <i>Cassoulet</i>                | Vegetable/Meat         | P            | Brittany          | 2002              | 2             |
| 28                 | Potato purée                    | Starchy food           | G            | Brittany          | 2007              | 2             |

| Isolate number (#) | Food product           | Food category          | Food company | Area of isolation | Year of isolation | M13-PCR group |
|--------------------|------------------------|------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 29                 | Meat stew              | Meat                   | A            | South of France   | 2007              | 2             |
| 30                 | Vegetable ravioli      | Vegetable/Starchy food | B            | South of France   | 2007              | 2             |
| 31                 | Bean in tomato sauce   | Vegetable              | -            | North of France   | 2003              | 2             |
| 32                 | Carrot                 | Vegetable              | L            | North of France   | 2007              | 2             |
| 36                 | Flageolet bean         | Vegetable              | A            | South of France   | 2004              | 2             |
| 37                 | Duck risotto           | Meat/Starchy food      | -            | South of France   | 2007              | 2             |
| 52                 | Mushroom               | Vegetable              | U            | Brittany          | 2005              | 2             |
| 53                 | Vegetable mix          | Vegetable              | K            | Brittany          | 2005              | 2             |
| 54                 | Vegetable for couscous | Vegetable              | L            | Picardy           | 2005              | 2             |
| 56                 | Smooth sweet pea       | Vegetable              | L            | North of France   | 2007              | 2             |
| 58                 | Bean in tomato sauce   | Vegetable              | L            | Picardy           | 2005              | 2             |
| 76                 | Potato purée           | Starchy food           | G            | Brittany          | 2007              | 2             |
| 77                 | Sweet pea              | Vegetable              | L            | North of France   | 2006              | 2             |
| 78                 | Vegetable mix          | Vegetable              | K            | Brittany          | 2006              | 2             |
| 80                 | Green lentils          | Vegetable              | -            | Brittany          | 2007              | 2             |
| 83                 | Flageolet bean         | Vegetable              | L            | Picardy           | 2005              | 2             |
| 84                 | Sweet corn purée       | Vegetable/Starchy food | G            | Brittany          | 2006              | 2             |
| 85                 | Green bean brine       |                        | L            | Picardy           | 2006              | 2             |
| 86                 | Green bean brine       |                        | L            | Picardy           | 2006              | 2             |
| 87                 | Polenta purée          | Starchy food           | -            | Aquitaine         | 2006              | 2             |
| 89                 | Bean                   | Vegetable              | L            | North of France   | 2009              | 2             |
| 90                 | Vegetable ravioli      | Vegetable/Starchy food | B            | North of France   | 2006              | 2             |
| 91                 | Vegetable ravioli      | Vegetable/Starchy food | B            | Picardy           | 2006              | 2             |
| 110                | Bleacher residue       |                        | -            | Brittany          | 2009              | 2             |
| 116                | Ham with fat liver     | Meat                   | C            | South of France   | 2010              | 2             |
| 117                | Ham and fat liver      | Meat                   | C            | South of France   | 2010              | 2             |
| 119                | Dietary cream dessert  | Milk/Starchy food      | -            | Brittany          | 2010              | 2             |
| 125                | Green bean             | Vegetable              | L            | Picardy           | 2010              | 2             |
| 126                | Sweet pea carrot       | Vegetable              | L            | Picardy           | 2010              | 2             |
| <b>DSM 22</b>      | <b>Type strain</b>     | canned food            | DSMZ         | nd                | nd                | 2             |
| 5                  | Sweet corn             | Vegetable              | -            | Aquitaine         | 2004              | 3             |
| 6                  | Sweet pea              | Vegetable              | L            | North of France   | 2004              | 3             |
| 24                 | Pea soup               | Vegetable              | D            | South of France   | 2007              | 3             |

| Isolate number (#) | Food product              | Food category          | Food company | Area of isolation | Year of isolation | M13-PCR group |
|--------------------|---------------------------|------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 25                 | Shellfish bisque          | Fish                   | F            | Picardy           | 2001              | 3             |
| 27                 | Potatoes purée            | Starchy food           | G            | Brittany          | 2007              | 3             |
| 38                 | Turkey in curry sauce     | Meat                   | M            | South of France   | 2004              | 3             |
| 44                 | Rice pudding              | Milk/Starchy food      | J            | Aquitaine         | 2008              | 3             |
| 47                 | Veal dumpling             | Meat/Starchy food      | X            | Burgundy          | 2005              | 3             |
| 55                 | Mushroom                  | Vegetable              | U            | Brittany          | 2005              | 3             |
| 57                 | Meat ball                 | Meat                   | T            | Burgundy          | 2005              | 3             |
| 59                 | Mixed vegetable           | Vegetable              | V            | South of France   | 2005              | 3             |
| 60                 | Vegetable salad and rice  | Vegetable/Starchy food | L            | North of France   | 2001              | 3             |
| 62                 | Beetroot                  | Vegetable              | -            | North of France   | 2001              | 3             |
| 66                 | Green bean                | Vegetable              | L            | Picardy           | 2008              | 3             |
| 67                 | Vegetarian salad          | Vegetable              | H            | Aquitaine         | 2004              | 3             |
| 79                 | <i>Cassoulet</i>          | Vegetable/Meat         | -            | South of France   | 2006              | 3             |
| 81                 | <i>Cassoulet</i>          | Vegetable/Meat         | A            | South of France   | 2006              | 3             |
| 82                 | Green bean brine          |                        | L            | Picardy           | 2006              | 3             |
| 92                 | Pasta gratin              | Starchy food           | Y            | South of France   | 2006              | 3             |
| 94                 | Sweet corn                | Vegetable              | S            | Aquitaine         | 2008              | 3             |
| 96                 | Mixture of vegetable      | Vegetable              | I            | Aquitaine         | 2009              | 3             |
| 97                 | Meatloaf and green lentil | Vegetable/Meat         | -            | South of France   | 2008              | 3             |
| 98                 | Cottage pie               | Meat/Starchy food      | A            | Aquitaine         | 2009              | 3             |
| 99                 | Veal stew and vegetable   | Vegetable/Meat         | -            | South of France   | 2009              | 3             |
| 100                | Rice pudding              | Milk/Starchy food      | -            | North of France   | 2009              | 3             |
| 101                | Baby food                 | Vegetable/.Meat        | B            | Picardy           | 2009              | 3             |
| 104                | Salmon ball               | Fish                   | X            | Burgundy          | 2009              | 3             |
| 105                | Hotdog sausage            | Meat                   | -            | Brittany          | 2009              | 3             |
| 107                | Soup                      | Vegetable              | B            | Picardy           | 2009              | 3             |
| 108                | Cream dessert             | Milk/Starchy food      | -            | Brittany          | 2009              | 3             |
| 109                | Green vegetable semolina  | Vegetable/Starchy food | B            | Picardy           | 2009              | 3             |
| 112                | Bleacher residue          |                        | O            | Brittany          | 2009              | 3             |
| 113                | Ham                       | Meat                   | C            | South of France   | 2010              | 3             |
| 114                | White bean and goose fat  | Vegetable              | L            | North of France   | 2010              | 3             |
| 118                | Dietary cream dessert     | Milk/Starchy food      | -            | Brittany          | 2010              | 3             |
| 120                | Dietary cream dessert     | Milk/Starchy food      | -            | Brittany          | 2010              | 3             |

| Isolate number (#) | Food product                     | Food category               | Food company | Area of isolation | Year of isolation | M13-PCR group |
|--------------------|----------------------------------|-----------------------------|--------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 121                | Vegetable soup                   | Vegetable                   | D            | South of France   | 2010              | 3             |
| 122                | Sweet corn                       | Vegetable                   | N            | Aquitaine         | 2001              | 3             |
| 127                | Pork and mushroom                | Vegetable/Meat              | W            | Aquitaine         | 2010              | 3             |
| 129                | Bean                             | Vegetable                   | L            | North of France   | 2010              | 3             |
| 135                | Vegetable mix                    | Vegetable                   | B            | Picardy           | 2001              | 3             |
| 137                | Vegetarian salad                 | Vegetable                   | H            | Aquitaine         | 2004              | 3             |
| <b>DSM 2313</b>    | <b>Collection strain</b>         |                             | DSMZ         | nd                | nd                | 3             |
| <b>DSM 5934</b>    | <b>Collection strain</b>         |                             | DSMZ         | nd                | nd                | 3             |
| <b>DSM 6790</b>    | <b>Collection strain</b>         |                             | DSMZ         | nd                | nd                | 3             |
| 65                 | Sweet pea                        | Vegetable                   | L            | North of France   | 2004              | 4             |
| 69                 | Green bean                       | Vegetable                   | -            | South of France   | 2006              | 4             |
| 123                | Chestnut chocolate flan          | Milk                        | -            | South of France   | 2010              | 4             |
| <b>DSM 297</b>     | <b>Collection strain</b>         | Canned food                 | DSMZ         | nd                | nd                | 4             |
| 22                 | Sweet corn                       | Vegetable                   | N            | Aquitaine         | 2001              | 5             |
| 33                 | Frozen bean                      | Vegetable                   | L            | Picardy           | 2003              | 5             |
| 34                 | Sweet pea                        | Vegetable                   | L            | North of France   | 2004              | 5             |
| 35                 | Sweet pea                        | Vegetable                   | L            | North of France   | 2004              | 5             |
| 102                | Sweet corn                       | Vegetable                   | S            | Aquitaine         | 2009              | 5             |
| 103                | Sweet corn                       | Vegetable                   | S            | Aquitaine         | 2009              | 5             |
| 106                | Sweet corn                       | Vegetable                   | I            | Aquitaine         | 2009              | 5             |
| 115                | Pork tripe                       | Meat                        | -            | South of France   | 2010              | 5             |
| 124                | Sweet pea carrot                 | Vegetable                   | -            | Brittany          | 2010              | 5             |
| 13                 | Snail                            | Meat                        | Q            | South of France   | 2009              | 6             |
| 14                 | Chestnut and mushroom            | Vegetable/Fruit             | L            | North of France   | 2009              | 6             |
| 19                 | Bean in tomato sauce             | Vegetable                   | L            | Picardy           | 2010              | 6             |
| 40                 | Green bean                       | Vegetable                   | L            | North of France   | 2007              | 6             |
| 71                 | Baby food                        | Vegetable/Meat              | B            | Picardy           | 2006              | 6             |
| 74                 | Pasta with vegetable and chicken | Vegetable/Starchy food/Meat | P            | Brittany          | 2006              | 6             |
| 128                | Pork and mushroom                | Vegetable/Meat              | W            | Aquitaine         | 2010              | 6             |

## Chapitre 4

### 1. Etude de la diversité génétique et phénotypique de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* isolées des conserves non-stables

#### 1.1 Objectifs et choix méthodologiques

Parmi les bactéries thermophiles responsables d'altérations des conserves alimentaires à 55°C, *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* est la plus fréquente puisqu'elle cause 36% des cas. Cette bactérie thermophile se développe dans des conditions strictement anaérobies. Cette espèce produit des spores les plus thermorésistantes parmi celles retrouvées dans les conserves alimentaires. Avec un D à 121°C supérieur à 30 minutes, la destruction des spores par le processus d'appertisation s'avère peu compatible avec le respect de la qualité organoleptique du produit fini. De ce fait, sa présence sur les lignes de production et sa persistance dans le produit fini après l'appertisation est un problème majeur pour les conserveurs. Ainsi, comme pour *G. stearothermophilus*, les industriels veulent comprendre comment et pourquoi *M. thermoacetica/thermoautotrophica* persiste sur les lignes de production. Une approche similaire a été mise en œuvre pour mieux connaître les caractéristiques de cette espèce. Dans cette étude, l'objectif est de caractériser la diversité génétique et phénotypique des souches de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolées de conserves non-stables à 55°C à partir de la collection établie au CTCPA sur une période de 10 ans.

Pour mener à bien ce projet, la méthode de typage M13-PCR mise au point précédemment a été appliquée avec succès. De plus, contrairement à *G. stearothermophilus*, le génome de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* était disponible dans les bases de données. Le développement de la méthode MLVA est passé par l'élaboration de quatre couples d'amorces, dessinés à partir des résultats de la recherche de VNTR sur le génome, qui ont ensuite été utilisés en PCR avec succès. Enfin, les capacités de croissance de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* ont été étudiées pour un nombre de souches sélectionnées sur la base de leur origine et leur diversité génétique, à travers différentes conditions de températures et de pH ainsi que la présence d'antibiotique dans le milieu de croissance. Pour

finir, la thermorésistance des spores produites dans les conditions optimales a été évaluée à 130°C.

## 1.2 Principaux résultats

Les quatre amorces développées pour la MLVA ont été utilisées pour le typage de 72 souches de *M. thermoacetica/ thermoautotrophica* et ont permis de déterminer 30 profile-types. Parallèlement, 21 profile-types ont été établis à partir de 85 souches de *M. thermoacetica/ thermoautotrophica* avec la méthode de la M13-PCR. Une importante diversité a été observée parmi ces isolats provenant de conserves alimentaires altérées à 55°C pour les deux méthodes testées. Les températures extrêmes de croissance pour 19 souches sélectionnées étaient de 45°C pour la plus basse et 68°C pour la plus haute. La plus faible valeur de pH initial enregistré pour laquelle une croissance bactérienne a été observée était de 4,5. Ces données laissent penser d'après la littérature scientifique certaines souches étudiées ici ont une plus forte similarité avec l'espèce *M. thermoautotrophica* que l'espèce *M. thermoacetica*. La thermorésistance, évaluée par le paramètre  $t_{5D}$  à 130°C, des souches isolées y compris les deux souches de références variait de 7 à 33 minutes. L'ensemble des résultats de cette étude est un complément d'informations essentielles pour aider les industriels dans la prévention de l'altération des conserves alimentaires causée par *M. thermoacetica/thermoautotrophica*. De façon générale, abaissé le pH ne sera pas une solution pour diminuer la prévalence de cette espèce. Il serait alors recommandé d'appliquer des températures supérieures à 70°C tout le long du procédé de production pour inhiber la croissance et la sporulation de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* et ainsi diminuer la charge bactérienne qui entre dans le produit avant le processus d'appertisation. Cependant, il sera nécessaire de prendre garde par l'application de telles mesures pour ne pas sélectionner des spores qui seraient encore plus résistantes.

## **2. Article 2: New insights in the physiology of the highly heat resistant spore forming bacteria *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica* involved in spoilage of canned foods**

Loïc DURAND, Fabienne REMIZE Marie-Hélène GUINEBRETIERE, Frédéric CARLIN, Stéphane ANDRÉ and Stella PLANCHON

Manuscrit en préparation pour soumission à BMC Microbiology

### **2.1 Abstract**

---

*Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* species forming highly heat resistant spores is the main cause of canned food spoilage at elevated temperature (55°C). At this time, the species *M. thermoacetica* and *M. thermoautotrophica* cannot be discriminated by physiological traits neither 16S rRNA gene sequence. In this study, we applied two typing methods, M13-PCR and Multiple Locus Variable-Number-Tandem-Repeats (VNTR) analysis (MLVA) which was specifically developed for genotyping *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates from canned food products. Four out of nine VNTR loci identified were used as markers for MLVA but only two were discriminatory. MLVA distinguished 30 profile-types among 78 isolates. The M13-PCR method gave 21 genotypes from 85 isolates. A great diversity among isolates from canned food was observed with both typing methods. The ability to grow at different pH and temperatures and the ability of spores to resist to high wet treatment were studied on 19 selected isolates. The temperature range for growth of *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates was comprised between 45°C and 68°C, and the minimal growth pH was 4.5. These data suggest a stronger similarity of tested isolates to the species *M. thermoautotrophica* than to *M. thermoacetica*. All isolates were resistant to cycloserin and ampicillin antibiotics. The D value at 130°C, characterizing spore wet heat resistance, varied from 1.4 to 6.6 minutes for the 19 tested isolates including two reference strains.

---

### **Keywords**

*Moorella thermoacetica/thermoautotrophica*, spoilage, canned food, MLVA, M13-PCR, diversity, growth, antibiotic resistance, wet heat resistance.



## 2.2 Introduction

Thermophilic species have been primarily isolated from hot environments but are also found naturally in soils (Collins *et al.*, 1994; Gossner *et al.*, 1999; Marchant *et al.*, 2002). Non-pathogenic species are generally poorly studied except for their potential industrial applications such as production of heat stable enzymes or metabolites (Drake *et al.*, 2008). Several of these thermophilic species were frequently detected in processed foods with or without spoilage such as *Geobacillus* spp. (*Geobacillus stearothermophilus*, *Geobacillus thermoamylovorans*, *Geobacillus thermodenitrificans*), *Bacillus* spp. (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Bacillus sporothermodurans*), *Desulfuromaculum* spp., *Thermoanaerobacterium* spp. and *Moorella* spp. (Rueckert *et al.*, 2005; Burgess *et al.*, 2010; Postollec *et al.*, 2012; André *et al.*, 2013). The former genus encloses four species: *Moorella thermoacetica* (Fontaine *et al.*, 1942), *Moorella thermoautotrophica* (Wiegel *et al.*, 1981), *Moorella glycerini* (Slobodkin *et al.*, 1997), and *Moorella mulderi* (Balk *et al.*, 2003). The type species of this genus is *Moorella thermoacetica* and the type strain DSM 521 was isolated from horse manure. This species, originally described as *Clostridium thermoaceticum*, was separated from Clostridia by its high GC percentage and its relative closeness to *Moorella thermoautotrophica* (*Clostridium thermoautotrophicum*). Separation of these two species is challenging and *M. thermoautotrophica* could be considered as a subspecies of *M. thermoacetica* (Collins *et al.*, 1994). The 16S ribosomal RNA gene sequence (rRNA), commonly used to differentiate species, is borderline for the separation of these two species (99% identity). Both species share close phenotypic traits that are now recognized as not sufficient for species differentiation (Collins *et al.*, 1994). Thermophilic species form spores nowadays identified as the most heat resistant in the food industry (Wagner and Wiegel, 2008; André *et al.*, 2013). Thus, they withstand thermal treatments used to stabilize canned food. Spoilage depends on several factors such as incubation temperature, food pH and food composition. *M. thermoacetica/thermoautotrophica* development results in a strong product acidification with or without can swelling depending on the available carbon source (Ashton and Bernard, 1992; Olson and Sorrells, 1992). Six isolates of *Moorella* spp. were identified from spoiled canned food including a fish soup and cooked meat (Carlier *et al.*, 2006). In a ten year survey, *M. thermoacetica/thermoautotrophica* species were encountered in 36% of spoiled canned foods after incubation at 55°C during seven days (André *et al.*, 2013). Interestingly, isolates were more frequently found in green peas and carrots, in lentils

and sausages and in cottage pie, which corresponded to food treated at very high sterilization values.

We studied a panel of 87 *M. thermoacetica/thermoautotrophica* strains coming from various origins (canned vegetables, ready-to-eat canned meals and soils), years and food factory including two reference strains. The aim of this study was to determine genetic diversity within *M. thermoacetica/thermoautotrophica* species and to increase knowledge in the physiology of these species.

## 2.3 Material and methods

### 2.3.1 Strains and culture conditions

A total of 87 strains were tested in this study (**Table 1**). Among them, 83 strains were selected between 2002 and 2011 from spoiled canned food after long-term storage at 55°C (André *et al.*, 2013). Two isolates (#83 and #82) were isolated from soil in Brittany. All isolates were identified as *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* using either a specifically developed PCR tool (SporeTraQ™) (Prevost *et al.*, 2010) that targets the DNA region corresponding to 16S rRNA sequence, or partial sequencing of this region. Two strains were obtained from the DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany) and the ATCC (American Type Culture Collection, Molsheim, France) collections (DSM 521, ATCC 39073). DSM521 strain has been isolated from horse manure and origin of ATCC 39073 is not specified. Genome of this strain was fully sequenced in 2008 (Pierce *et al.*, 2008) and is available on the NCBI website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>). Strains were stored at -80°C in a cryogenic preservative solution with beads (AES Chemunex, Bruz, France).

Two or three beads of a stock culture were dropped into Rosenow broth (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) modified by addition of 1 g/L soluble starch and covered with paraffin before incubation for 7 days at 55°C. Medium was boiled during 10 minutes to remove traces of oxygen just before inoculation. A 500 µl volume of this revived culture was inoculated into modified Rosenow broth and incubated 5 days at 55°C in anaerobiosis. The resulting pre-culture was used for subsequent inoculation for growth and sporulation studies.

**Table 1: Origin of *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates tested in this study**

| Isolate number | Origin                  | Origin category    | Food company    | Area of isolation | Year of isolation | M13-PCR PT <sup>a</sup> | MLVA PT <sup>a</sup> |
|----------------|-------------------------|--------------------|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|
| 12             | Cassoulet               | Meat/Vegetable     | M               | Britanny          | 2004              | 1                       | 5                    |
| 13             | Cassoulet               | Meat/Vegetable     | M               | Center            | 2004              | 1                       | 7                    |
| 22             | Green pea               | Vegetable          | S               | Aquitaine         | 2004              | 1                       | 5                    |
| 84             | DSMZ 521                | Horse faeces       | NA <sup>c</sup> |                   |                   | 1                       | 4                    |
| 89             | Green pea               | Vegetable          | O               | Burgundy          | 2009              | 1                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 91             | Green pea               | Vegetable          | O               | Burgundy          | 2010              | 1                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 54             | White bean              | Vegetable          | λ               | Britanny          | 2009              | 2                       | 15                   |
| 87             | Green pea and carrot    | Vegetable          | O               | Burgundy          | 2006              | 2                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 88             | Green pea               | Vegetable          | O               | Burgundy          | 2009              | 2                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 90             | Green pea               | Vegetable          | O               | Burgundy          | 2009              | 2                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 96             | Green pea               | Vegetable          | O               | Burgundy          | 2011              | 2                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 98             | ATCC 39073              | NA <sup>c</sup>    | NA <sup>c</sup> |                   |                   | 2                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 14             | Mushroom cream          | Vegetable          | F               | Alsace            | 2007              | 3                       | 6                    |
| 16             | Lentils sausages        | Meat/Vegetable     | M               | Center            | 2004              | 3                       | 22                   |
| 19             | Green pea and carrot    | Vegetable          | L               | Picardy           | 2007              | 3                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 35             | Green bean              | Vegetable          | L               | Picardy           | 2003              | 3                       | 15                   |
| 49             | Green pea               | Vegetable          | L               | North of France   | 2006              | 3                       | 13                   |
| 56             | Green pea               | Vegetable          | L               | Picardy           | 2006              | 3                       | 5                    |
| 65             | Cottage pie             | Meat/Starchy food  | A               | Aquitaine         | 2009              | 3                       | 6                    |
| 97             | Green pea               | Vegetable          | O               | Burgundy          | 2011              | 3                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 6              | Pea soup                | Vegetable          | F               | Alsace            | 2007              | 4                       | 18                   |
| 7              | Garden pea              | Vegetable          | L               | North of France   | 2007              | 4                       | 5                    |
| 9              | Stuffed cabbage         | Meat/Vegetable     | R               | Aquitaine         | 2004              | 4                       | 5                    |
| 10             | Stuffed cabbage         | Meat/Vegetable     | R               | Aquitaine         | 2004              | 4                       | 5                    |
| 58             | Chopped parsley         | Vegetable          | U               | Britanny          | 2008              | 4                       | 19                   |
| 64             | Mushroom                | Vegetable          | U               | Britanny          | 2009              | 4                       | 29                   |
| 85             | Green pea and carrot    | Vegetable          | O               | Burgundy          | 2006              | 4                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 93             | Green pea               | Vegetable          | O               | Burgundy          | 2011              | 4                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 20             | Mushroom                | Vegetable          | U               | Britanny          | 2008              | 5                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 23             | Paëlla                  | Meat/Starchy food  | φ               | Britanny          | 2004              | 5                       | 5                    |
| 1              | Cottage pie             | Meat/Starchy food  | Y               | South of France   | 2007              | 6                       | 1                    |
| 2              | Cottage pie             | Meat/Starchy food  | A               | South of France   | 2007              | 6                       | 10                   |
| 4              | Ravioli                 | Meat/ Starchy food | B               | Burgundy          | 2007              | 6                       | 12                   |
| 15             | Guinea fowl / vegetable | Meat/Vegetable     | π               | Britanny          | 2004              | 6                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 24             | Green bean              | Vegetable          | S               | Aquitaine         | 2005              | 6                       | 12                   |
| 25             | Green pea               | Vegetable          | L               | Center            | 2005              | 6                       | 13                   |
| 26             | Green bean              | Vegetable          | S               | Aquitaine         | 2005              | 6                       | 20                   |
| 30             | Mushroom                | Vegetable          | U               | Britanny          | 2005              | 6                       | 17                   |
| 42             | Vegetable brine         | Liquid             | L               | North of France   | 2005              | 6                       | 5                    |
| 46             | Chestnut purée          | Starchy food       | σ               | South of France   | 2008              | 6                       | 13                   |
| 47             | Green pea               | Vegetable          | L               | North of France   | 2006              | 6                       | 19                   |

| Isolate number | Origin                      | Origin category   | Food company | Area of isolation | Year of isolation | M13-PCR PT <sup>a</sup> | MLVA PT <sup>a</sup> |
|----------------|-----------------------------|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|
| 57             | Seafood                     | Fish              | ψ            | Burgundy          | 2008              | 6                       | 12                   |
| 59             | Meat ball with tomato sauce | Meat/Vegetable    | A            | South of France   | 2008              | 6                       | 12                   |
| 60             | Green pea                   | Vegetable         | O            | Burgundy          | 2008              | 6                       | 27                   |
| 62             | Green bean                  | Vegetable         | P            | Britanny          | 2008              | 6                       | 27                   |
| 63             | Ham                         | Meat              | B            | Picardy           | 2008              | 6                       | 27                   |
| 68             | Coucouis                    | Meat/Starchy food | A            | South of France   | 2009              | 6                       | 4                    |
| 69             | Green pea                   | Vegetable         | E            | Aquitaine         | 2009              | 6                       | 25                   |
| 70             | Green pea                   | Vegetable         | E            | Aquitaine         | 2009              | 6                       | 18                   |
| 72             | Meat with potatoes          | Meat/starchy food | G            | Britanny          | 2009              | 6                       | 20                   |
| 73             | Meat with potatoes          | Meat/starchy food | G            | Britanny          | 2009              | 6                       | 20                   |
| 40             | Diced mixed vegetable       | Vegetable         | L            | Picardy           | 2008              | 7                       | 2                    |
| 32             | Mushroom                    | Vegetable         | U            | Britanny          | 2005              | 8                       | 16                   |
| 48             | Turkey blanquette           | Meat              | M            | Center            | 2006              | 9                       | Nt <sup>b</sup>      |
| 55             | Green pea and carrot        | Vegetable         | P            | Britanny          | 2006              | 9                       | 30                   |
| 53             | Green pea                   | Vegetable         | L            | Picardy           | 2006              | 10                      | 2                    |
| 75             | Salt pork with lentils      | Meat/Vegetable    | α            | South of France   | 2010              | 10                      | 18                   |
| 76             | Salt pork with lentils      | Meat/Vegetable    | α            | South of France   | 2010              | 10                      | 18                   |
| 34             | Stroga                      | Meat/Vegetable    | B            | Burgundy          | 2007              | 11                      | 21                   |
| 27             | Milky drink                 | Milk              | ω            | Center            | 2008              | 12                      | 28                   |
| 31             | Chopped parsley             | Meat/Vegetable    | U            | Britanny          | 2008              | 12                      | 5                    |
| 36             | Lentil sausage              | Meat/Vegetable    | M            | Center            | 2004              | 12                      | 13                   |
| 37             | Lentil sausage              | Meat/Vegetable    | M            | Center            | 2004              | 12                      | 13                   |
| 41             | Green pea                   | Vegetable         | L            | North of France   | 2005              | 12                      | 7                    |
| 44             | Ravioli                     | Meat/Starchy food | B            | Picardy           | 2007              | 12                      | 13                   |
| 66             | Chicken with mushroom       | Meat/Vegetable    | G            | Britanny          | 2009              | 12                      | 20                   |
| 74             | Green pea                   | Vegetable         | Σ            | Picardy           | 2009              | 13                      | 15                   |
| 78             | Spinach                     | Vegetable         | K            | Britanny          | 2010              | 14                      | 24                   |
| 83             | Ground                      | NA <sup>c</sup>   | O            | Britanny          | 2010              | 15                      | 15                   |
| 43             | Pasta                       | Starchy food      | B            | Picardy           | 2005              | 16                      | 5                    |
| 3              | Green pea                   | Vegetable         | L            | Picardy           | 2002              | 17                      | 8                    |
| 11             | Salt pork                   | Meat              | M            | Center            | 2004              | 17                      | 11                   |
| 21             | Salt pork with lentils      | Meat/Vegetable    | M            | Center            | 2004              | 17                      | 5                    |
| 28             | Green pea                   | Vegetable         | L            | North of France   | 2004              | 17                      | 26                   |
| 51             | Green pea                   | Vegetable         | L            | North of France   | 2006              | 17                      | 2                    |
| 61             | Diced mixed vegetable       | Vegetable         | L            | Picardy           | 2009              | 17                      | 8                    |
| 71             | Meat with pepper sauce      | Meat              | G            | Britanny          | 2009              | 17                      | 20                   |
| 77             | Mushroom sauce              | Vegetable         | Φ            | Britanny          | 2010              | 17                      | 3                    |
| 50             | Green pea                   | Vegetable         | L            | North of France   | 2006              | 18                      | 15                   |

| Isolate number | Origin                  | Origin category   | Food company | Area of isolation | Year of isolation | M13-PCR PT <sup>a</sup> | MLVA PT <sup>a</sup> |
|----------------|-------------------------|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|-------------------------|----------------------|
| 79             | Spinach                 | Vegetable         | K            | Britanny          | 2010              | 18                      | 24                   |
| 38             | Leek                    | Vegetable         | π            | Center            | 2007              | 19                      | 15                   |
| 81             | Green pea               | Vegetable         | L            | Picardy           | 2010              | 19                      | 28                   |
| 82             | Ground                  | NA <sup>c</sup>   | O            | Britanny          | 2010              | 19                      | 15                   |
| 94             | Green pea               | Vegetable         | O            | Burgundy          | 2011              | 20                      | Nt <sup>b</sup>      |
| 39             | Green pea and carrot    | Vegetable         | L            | Picardy           | 2004              | 21                      | 22                   |
| 5              | Garden pea              | Vegetable         | L            | North             | 2007              | Nd                      | 3                    |
| 17             | Lentils Sausages        | Meat/Vegetable    | M            | Center            | 2004              | Nd                      | 23                   |
| 18             | Sweet corn              | Vegetable         | L            | South             | 2004              | Nd                      | 24                   |
| 33             | Sweet peas carrot       | Vegetable         | π            | Center            | 2007              | Nd                      | 14                   |
| 45             | Cottage pie             | Meat/Starchy food | Y            | South             | 2006              | Nd                      | 7                    |
| 52             | Cottage pie with duck   | Meat/Starchy food | A            | Aquitaine         | 2006              | Nd                      | 7                    |
| 67             | Paella valenciana       | Meat/Starchy food | A            | South             | 2009              | Nd                      | 15                   |
| 80             | Cottage pie with carrot | Meat/Vegetable    | ō            | Britanny          | 2010              | Nd                      | 18                   |

<sup>a</sup> PT is profile-type; <sup>b</sup> Nt: not tested; <sup>c</sup> NA: not applicable

### 2.3.2 Genetic study

#### • M13-PCR typing method

##### DNA extraction

A 200 µl volume of a 5 days culture in modified Rosenow broth was spread on Meat Liver agar supplemented with 2 g/L yeast extract and incubated for 5 days at 55°C in anaerobic condition (AnaeroGen Compact, Oxoid) before DNA extraction. DNA preparation was obtained as described previously (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003) with minor modifications. Two loops of cells were suspended in 550 µl extraction buffer (1.7% sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA, 200 mM NaCl). The suspension was incubated at 55°C for 1h min with 25 µl of proteinase K (10 µg µl<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). DNA was extracted with one volume of phenol. After centrifugation 13000 x g, 5 min, the aqueous phase containing DNA was mixed with one volume of phenol, recovered after centrifugation, and then mixed again with one volume of phenol. The aqueous phase was collected and the extraction was completed by a phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1) extraction step. Finally, the aqueous phase was precipitated with absolute ethanol at -20°C. After centrifugation 20 min at 13000 x g, the pellet was washed with cold 70% ethanol, air dried at room temperature, dissolved in 50 µl sterile ultrapure water, and stored at -20°C. Prior to quantification, DNA suspension was incubated 15 min à 37°C with 2 µL of RNase A (0.7U/µL). DNA was quantified by

absorbance at 260 nm (NanoQuant Plate™ Infinite® M200, Tecan Austria), then stored at -20°C before use. DNA extraction was repeated three times from independent cultures of randomly selected 24 strains to evaluate the reproducibility of genomic analyses.

#### *Amplification of M13 region*

The M13-PCR method used was previously described by (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003) with minor modifications. PCR mix (25 µl) contained 50 ng of DNA template, 4.8 mM primer PM13: 5'-GAGGGTGGCGGCTCT-3' (Eurogentec S.A., Seraing, Belgium), 1.25 mM dNTPs mix (Eurogentec), 6 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 10% (vol/vol) dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich), and 1.5 U of Diamond Taq® DNA polymerase (Eurogentec) in supplier buffer. PCR amplifications were performed in a GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). PCR cycling parameters included a denaturation step at 94°C for 3 min followed by 35 cycles each consisting of 94°C for 1 min, 40°C for 1 min and 68°C for 8 min; and a final extension step at 68°C for 16 min. A negative control containing ultrapure water instead of DNA and a positive control with the DNA of *B. cereus* strain ATCC 14579 producing a known banding pattern were included in each PCR experiment.

#### *Electrophoresis and data analysis*

PCR products from M13-PCR were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels with the molecular mass DNA marker Smart Ladder (Eurogentec) using 0.5× TAE buffer (20 mM Tris, 10 mM acetic acid, 0.5 mM EDTA, pH 8). Gels were stained with ethidium bromide and visualized and photographed on a UV gel imager (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System 170-8170, BioRad, France). Band position, similarity coefficient and dendrogram were determined using the BioGene 99.04 software (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) for M13 profiles analysis. A dendrogram was constructed from the similarity banding pattern of M13-PCR amplification using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) and DICE's coefficient. All the DNA preparations were analyzed by M13-PCR twice independently to evaluate the reproducibility of electrophoresis profiles. The *B. cereus* ATCC 14579 was chosen as positive control to evaluate the variability generated by the analyses (PCR-electrophoresis-image analysis). The confidence interval on band size was adjusted to obtain 100% similarity between experimental replicates. The similarity threshold was adjusted to obtain the maximum of robustness for genetic group formation.

• ***MLVA typing method***

*DNA extraction*

One ml of a 5 days preculture in Rosenow broth was centrifuged 1 min at 12000 x g and the cell pellet was suspended in 200 µl of Instagen® matrix kit (Bio-Rad, France). Then, DNA was extracted according to the manufacturer's instructions.

*Primers development and PCR amplification*

The program “The Microorganisms Tandem Repeats Database” (TMTRD) (Grissa *et al.*, 2008), available in the website: <http://minisatellites.u-psud.fr>, was used to locate repeated regions within the genome sequence of *Moorella thermoacetica* ATCC 39073. Nineteen potential VNTR loci were identified, and nine loci were chosen based on repeat size (100-500 bp) and copy number (>2). Nine primer pairs were designed from the left and right 500 bp regions flanking VNTR using Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Primers pairs were designated Moo-A to Moo-I (**Table 2**).

PCR mixture (25 µl) contained 5 µL of DNA template, 0.2 mM dNTPs mix (Eurogentec), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 2 U of Diamond Taq® DNA polymerase (Eurogentec) in supplier buffer and 0.4 µM of each primer. PCR cycling parameters included a denaturation step at 94°C for 5 min followed by 35 cycles each consisting of 94°C for 1 min, 53°C for 1 min and 72°C for 1 min; and a final extension step at 72°C for 10 min.

*Electrophoresis analysis*

PCR products of different sizes were visualized after 2% agarose gel electrophoresis using 0.5× TAE buffer (20 mM Tris, 10 mM acetic acid, 0.5 mM EDTA, pH 8). Gels were stained with ethidium bromide and photographed on a UV gel imager (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System 170-8170, BioRad, France). A genotype was created for each isolates by assigning an MLVA genotype (MT).

**Table 2: *Moorella* VNTR loci characteristics with primer designations and sequences**

| Locus | Repeat size (pb) | Copy number | Primer name | Primer sequence              | Predicted annealing temp (°C) | Amplified fragment size (pb) |
|-------|------------------|-------------|-------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| Moo-A | 12               | 6.3         | Moo-A_F     | 5'-AAAAGGAGGCTGAGACAATCA-3'  | 53.1                          | 197                          |
|       |                  |             | Moo-A_R     | 5'-CACCTTTTCTTCCAGGTCA-3'    | 50.8                          |                              |
| Moo-B | 12               | 7.4         | Moo-B_F     | 5'-AAGTCCCGTGGCTTTGAA-3'     | 53.0                          | 229                          |
|       |                  |             | Moo-B_R     | 5'-GGAGGTGGAACGGATGATTTA-3'  | 53.4                          |                              |
| Moo-C | 15               | 3.6         | Moo-C_F     | 5'-AAAGAACAATTTGGACCCG-3'    | 50.0                          | 198                          |
|       |                  |             | Moo-C_R     | 5'-ATTAAAGAGGGTCCACCTGA3'    | 52.5                          |                              |
| Moo-D | 33               | 5.8         | Moo-D_F     | 5'-GCTACAACAATACCTGCTGC-3'   | 50.0                          | 365                          |
|       |                  |             | Moo-D_R     | 5'-GACAGGATAGGGAGCATCAA-3'   | 52.5                          |                              |
| Moo-E | 33               | 8.5         | Moo-E_F     | 5'-GCAATGTGGCTATCGTG-3'      | 50.0                          | 477                          |
|       |                  |             | Moo-E_R     | 5'-TTCTCTTACAGCGTATCGAC-3'   | 51.0                          |                              |
| Moo-F | 12               | 4.8         | Moo-F_F     | 5'-GAGGATATTATCAACAGCGACC-3' | 52.4                          | 345                          |
|       |                  |             | Moo-F_R     | 5'-GATAATCTGCTGCAGGACA-3'    | 50.9                          |                              |
| Moo-G | 12               | 5.7         | Moo-G_F     | 5'-GAGGATATTATCAACAGCGACC-3' | 52.4                          | 357                          |
|       |                  |             | Moo-G_R     | 5'-GATAATCTGCTGCAGGACA-3'    | 50.9                          |                              |
| Moo-H | 12               | 5.7         | Moo-H_F     | 5'-GAGGATATTATCAACAGCGACC-3' | 52.4                          | 355                          |
|       |                  |             | Moo-H_R     | 5'-GATAATCTGCTGCAGGACA-3'    | 50.9                          |                              |
| Moo-I | 18               | 3.2         | Moo-I_F     | 5'-TAAACGTTCCAGGATGCG-3'     | 51.5                          | 249                          |
|       |                  |             | Moo-I_R     | 5'-CGTATGGGTGATAGGCAG-3'     | 50.7                          |                              |

### 2.3.3 Phenotypic study

#### • Growth at different temperatures and pH

Growth was performed on Dextrose Tryptone Broth (DTB) because acidification of this medium can be easily performed. Initial pH was adjusted after autoclaving by adding HCl 2N (Fischer Scientific SAS, Illkirch, France). This medium contains a low percentage of agar that contributes to maintain anaerobiosis with paraffin stopper above the medium.

A volume of 500 µl of five days culture was spread on DTB medium at different pH (4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0). Incubation was performed at different temperatures 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 65°C, 68°C and 70°C. Growth was checked every 24 h during 21 days by visualization of turbidity of the medium. Strains were considered positive for growth when turbidity was equivalent to 0.5-1 McFarland units corresponding to an optical density at 600 nm of 0.1-0.2. Strains with negative growth were checked a second time for growth in the same condition.



- ***Antibiotic resistance***

A 500µl volume of a five days culture was inoculated in DTB medium, as described above, with or without antibiotic. Five antibiotics (ampicillin, erythromycin, cycloserin, tetracyclin and methicillin) were tested at different concentrations: from 0.5 to 32 µg/ml (0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 and 32.0 µg/ml) for the former antibiotic and 2 and 4 µg/mL for the four others. Growth was checked every 24h during 21 days as described above.

- ***Spore production and heat resistance***

For spore production, protocol was followed as previously described (André *et al.*, 2013). Heat resistance at 130°C was determined as followed. The number of surviving spores was evaluated after 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8 and 10 minutes in capillary tubes. Serial decimal dilutions of the content of capillary tubes in 0.2 M phosphate buffer were spread onto Meat Liver modified agar medium and then covered with another layer of molten medium at 50°C. Plates were incubated at 55°C for 7 days in anaerobiosis (AnaeroGen Compact, Oxoid) before colony counts. Graphical log plots of surviving population vs heating time ( $\log \text{CFU/mL} = f(t)$ ) were fitted according to log-linear model according to the following equation:  $\log N = \log N_0 - \frac{t}{D}$  where  $N_0$  and  $N$  are the initial and final number of cells (CFU/mL) after a treatment time  $t$  (min), respectively, and  $D$  is the decimal reduction time (min).

#### 2.3.4 Statistical analysis

Qualitative data were analyzed by multiple correspondence analysis (MCA) with the software XLSTAT (AddinsoftTM, Paris, France). The variables tested were either (i) food category/product for isolation, food company, geographical location and year of isolation for the whole strains of the study, or (ii) lowest temperature, highest temperature, lowest pH, highest pH at which a growth was observed, and D130°C value for the strains selected for phenotypic study. Observations were isolate numbers and M13-PCR or MLVA group numbers.

## 2.4 Results

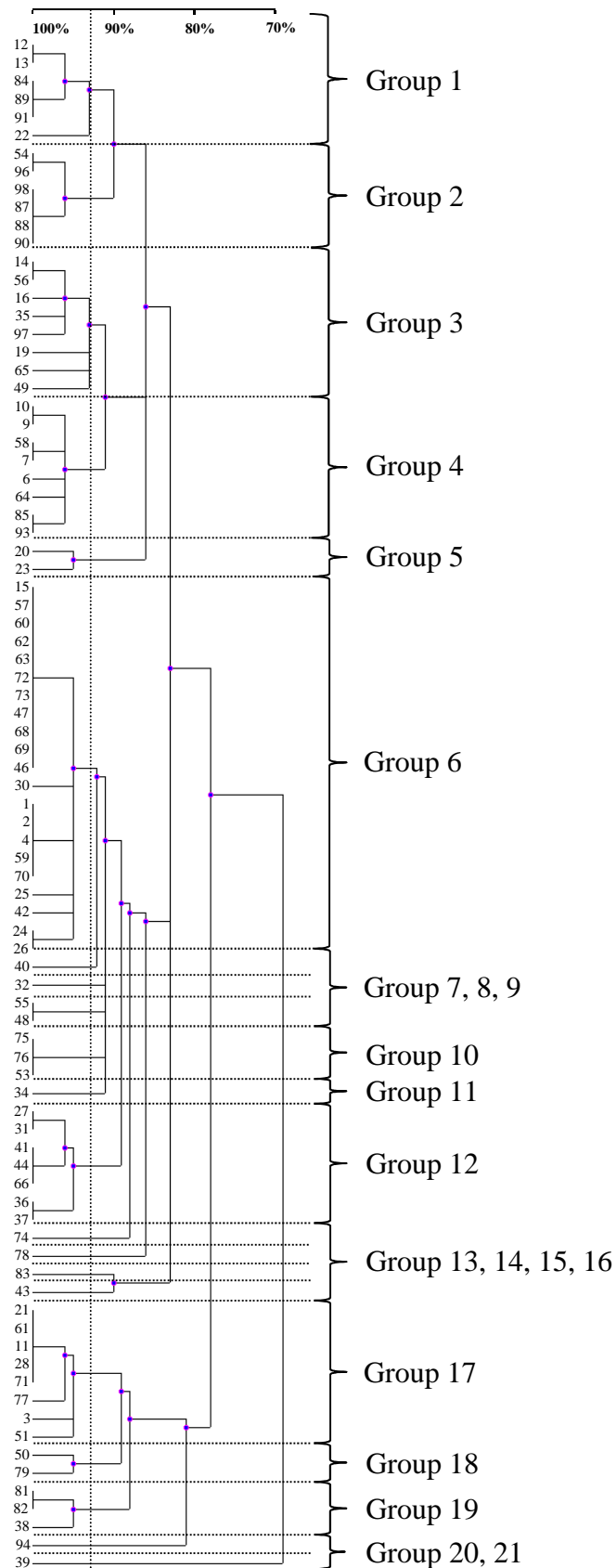
### 2.4.1 Molecular typing of isolates

A collection of 87 *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates essentially coming from spoiled canned foods and environment of vegetable processing was used for genotyping (**Table 1**).

#### • *M13-PCR typing results*

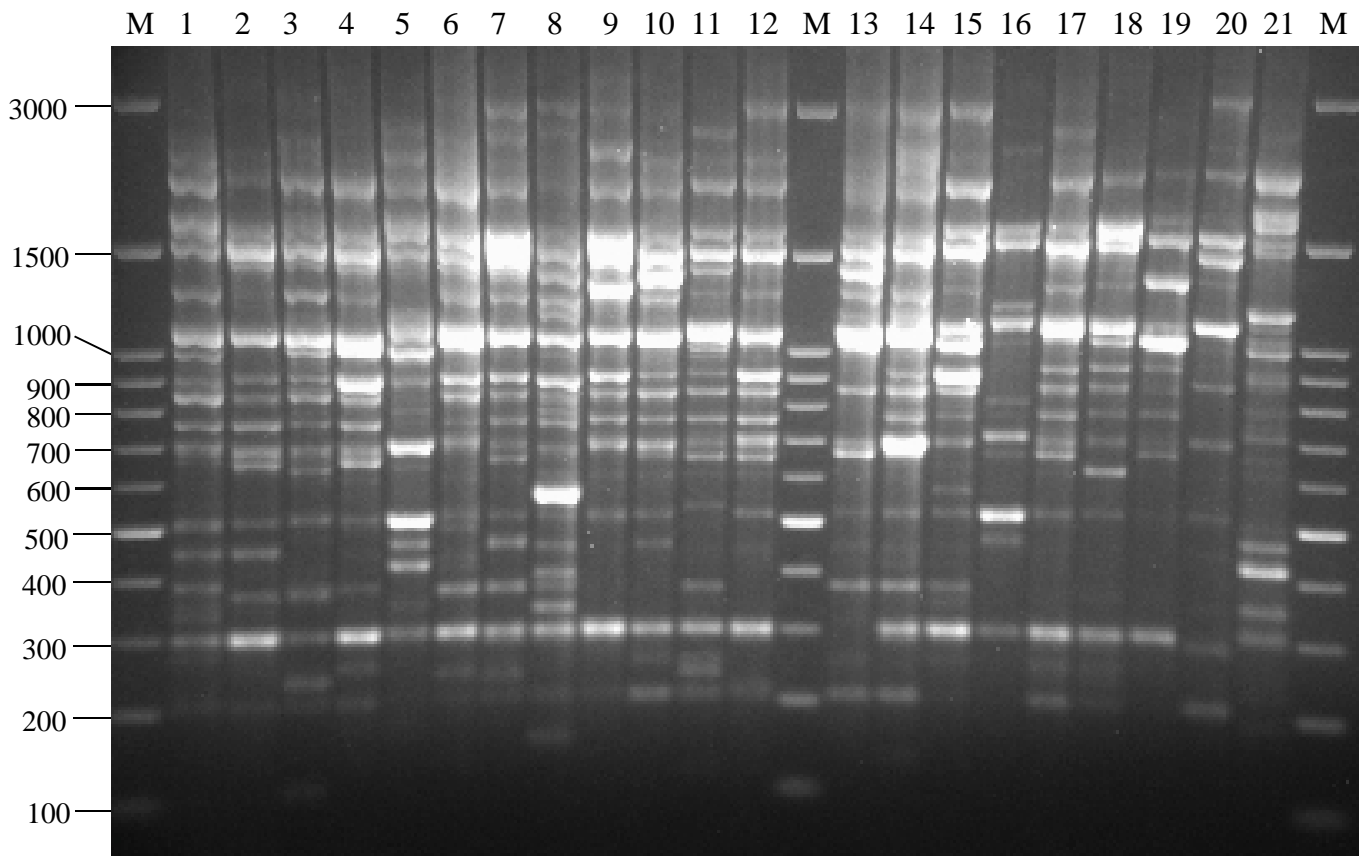
Electrophoresis patterns were obtained for 85 strains. The number of DNA bands detected varied from 13 to 23 bands ranging between 100 and 3000 bp. A dendrogram was built to determine the relatedness between strains (**Figure 1**). Twenty one different profile-types were obtained with a 93% similarity threshold (**Figure 2**). From the 21 profile-types, 12 groups were obtained and nine strains corresponded to independent profile-types. Among these 12 groups, five profile-types gathered two or three strains and six profile-types gathered six to eight strains. The profile-type 6 was the most frequently observed and gathered 21 out of 84 isolates. Profile-type 6 gathered most of isolates collected in 2008 but they originated from diverse areas and foods. Two strains isolated in 2007 from cottage pie from two different food companies geographically close belonged to profile-type 6. Interestingly, profile-types 1, 2 and 4 contained nine out of 11 isolates coming from the O food industry (**Table 1**). On the opposite, the 19 isolates from the L food company were distributed in ten different profile-types. Strains isolated from green peas, which are the most frequent food spoiled by *M. thermoacetica*, were distributed in 12 different profile-types. Lastly, every couple of isolates collected from the same food, the same year and the same place exhibited the same profile-type: that was observed for 9/10, 72/73, 75/76, 36/37, plus 69/70, 24/26, 49/56, 11/21 and 88/90. However, that was not the case for the three couples 66/71 (same origin than 72/73), 78-79 and 82-83.

Possible relationships between profile-type and strain origin was investigated by multiple correspondence analyses (MCA) but any 2D projection was robust enough to propose a relationship (data not shown).



**Figure 1: Dendrogram of *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates genetic relationship obtained by M13-PCR**

The percentage of similarity represented by the horizontal scale was calculated using Dice's coefficient and clustered by UPGMA. Groups formed at 93% of similarity threshold are separated with the vertical scale



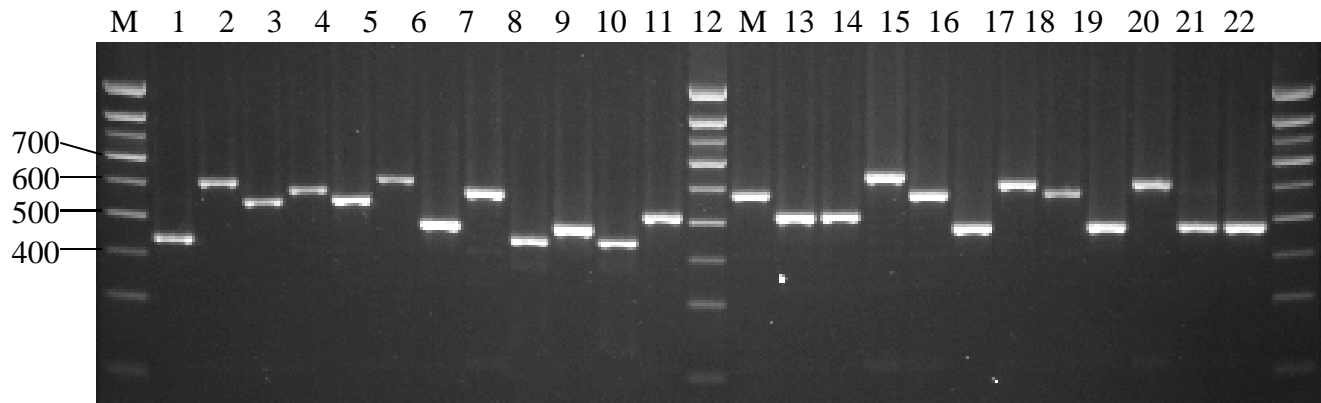
**Figure 2: M13-PCR banding profile of 21 *M. thermoacetica/thermoautotrophica* strains**

Lane 1-12: strains 13, 98, 14, 6, 23, 57, 40, 32, 48, 75, 34 and 36. Lane 13-21: strains 74, 78, 83, 43, 3, 50, 38, 94, and 39. Lanes M: DNA molecular size marker 100bp DNA ladder RTU (Nippon Genetics)

• ***MLVA typing results***

Among the 19 VNTR loci identified using TMTRD, only nine exhibited suitable copy number and repeat length. The nine primer pairs were tested on 12 different strains of *M. thermoacetica/thermoautotrophica*. Unique fragments were amplified for four primer pairs. The characteristics of the four VNTR loci, amplified by the primer pairs Moo-C, Moo-E, Moo-F and Moo-I, are presented in **table 2**.

From the collection, 72 *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates were analyzed with these four primer pairs. Moo-C and Moo-I amplification resulted in a single length amplified fragment for all isolates with expected size, respectively at 198 bp and 249 bp for Moo-C and Moo-I. Moo-E amplification resulted in eight different amplicon sizes ranged between 400 bp and 700 bp depending on the isolate and Moo-F in nine amplicon sizes ranged between 300 bp and 500 bp. An example of electrophoretic profile showing length polymorphism for Moo-E between isolates can be seen in **Figure 3**.



**Figure 3: Example of Moo-E locus amplicons from *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates**

Lanes 1-24: *Moorella* isolates. Lane M: DNA molecular size marker Smart Ladder SF (eurogentec)

Consequently, only Moo-E and Moo-F amplification results were discriminatory between isolates and their combination resulted in 30 profile-types.

Among the 72 tested isolates, 13 of them exhibited independent profile-types and 13 groups with the same profile-type gathered two to four isolates only. Three groups, corresponding to profile-types 13, 15 and 20 gathered respectively six, eight and five strains. And the main group was constituted of 11 isolates and named profil-type 5. As for M13-PCR, isolates from the same food product, the same year and the same company exhibited in most cases the same profile-type: it was the case for 9/10, 72/73, 75/76 and 36/37, plus for 66/71, 78/79 and 82/83, but not for 49/56, 24/26, 69/70 and 11/21. As for M13-PCR, multiple correspondence analyses (MCA) did not point out significant relationships between isolate origins and MLVA profile-types.

#### 2.4.2 Phenotypic characterization of isolates

##### • *Temperature and pH range for growth*

A total of 18 strains with different origins plus one reference strain (DSM 521) were selected to characterize their ability to grow at different temperatures (40°C-70°C range) and pH (4.0-7.0 range) (**Table 3**).

**Table 3: Ability of selected isolates of *Moorella* to grow at different temperatures and pH**

| Strain number | Time to growth at indicated pH and temperature (°C) <sup>a</sup> |    |      |     |      |     |    |    |      |     |     |   |      |    |      |    |      |
|---------------|--|----|------|-----|------|-----|----|----|------|-----|-----|---|------|----|------|----|------|
|               | 40°C   |    | 45°C |     | 50°C |     |    |    | 55°C |     |     |   | 65°C |    | 68°C |    | 70°C |
|               | pH   | 7  | 7    | 4.5 | 5.0  | 5.5 | 6  | 7  | 4.5  | 5.0 | 5.5 | 6 | 7    | 7  | 4.5  | 7  | 7    |
| DSM521        | ng   | 12 | ng   | ng  | ng   | 7   | 4  | ng | ng   | ng  | 2   | 2 | 3    | ng | 7    | ng |      |
| 91            | ng   | 12 | ng   | ng  | ng   | 4   | 7  | 12 | 5    | 2   | 2   | 2 | 3    | 7  | 7    | ng |      |
| 16            | ng   | ng | ng   | ng  | 7    | 3   | 4  | 12 | 7    | 2   | 2   | 2 | 3    | ng | ng   | ng |      |
| 19            | ng   | 12 | ng   | ng  | 4    | 4   | 7  | ng | 2    | 5   | 2   | 2 | 3    | ng | ng   | ng |      |
| 35            | ng   | ng | ng   | ng  | 7    | 4   | ng | ng | 7    | 2   | 2   | 2 | 3    | ng | ng   | ng |      |
| 10            | ng   | ng | ng   | ng  | ng   | 4   | 7  | 7  | 7    | 5   | 2   | 2 | 3    | ng | 7    | ng |      |
| 58            | ng   | ng | ng   | ng  | 7    | 4   | 4  | 12 | 5    | 2   | 2   | 5 | 3    | ng | ng   | ng |      |
| 30            | ng   | ng | ng   | ng  | ng   | ng  | ng | 9  | 5    | 5   | 2   | 5 | 3    | 7  | 7    | ng |      |
| 60            | ng   | 12 | ng   | ng  | 7    | 4   | 4  | 9  | 7    | 7   | 7   | 7 | 3    | ng | 7    | ng |      |
| 3             | ng   | ng | ng   | nt  | nt   | nt  | nt | ng | ng   | 3   | 3   | 3 | nt   | ng | nt   | ng |      |
| 27            | ng   | 12 | ng   | ng  | 7    | 4   | 7  | 12 | 2    | 2   | 2   | 2 | 3    | 7  | 7    | ng |      |
| 83            | ng   | ng | ng   | 7   | 7    | 4   | 4  | 9  | 7    | 5   | 5   | 2 | 3    | ng | 7    | ng |      |
| 43            | ng   | ng | ng   | 7   | 3    | 4   | 4  | 12 | 5    | 5   | 2   | 2 | 3    | ng | ng   | ng |      |
| 11            | ng   | 12 | ng   | ng  | 7    | 4   | 3  | 5  | 5    | 2   | 2   | 5 | 3    | ng | 7    | ng |      |
| 50            | ng   | 12 | ng   | ng  | ng   | 4   | 7  | 12 | 5    | 2   | 2   | 5 | 3    | ng | ng   | ng |      |
| 79            | ng   | 9  | ng   | ng  | ng   | ng  | 7  | 5  | 2    | 2   | 2   | 2 | 3    | ng | ng   | ng |      |
| 38            | ng   | ng | ng   | 7   | 4    | 3   | 3  | 12 | 5    | 2   | 2   | 5 | 3    | ng | nt   | ng |      |
| 52            | ng   | 12 | ng   | 7   | 4    | 3   | 4  | 12 | 5    | 2   | 2   | 2 | 3    | ng | ng   | ng |      |

<sup>a</sup> growth is expressed in day-value  
 ng, no growth; nt, not tested

The results showed that optimal growth temperature was comprised between 55°C and 65°C. At 55°C, all isolates developed within 48h in DTB with an initial pH of 7.0, 6.0 and 5.5 except the DSM 521 strain for the lowest pH. An initial pH of 6.0 resulted in faster growth for six isolates compared to pH 7.0 at 55°C. When initial pH was adjusted below 5.5, the growth of only two strains out of 18 was impaired at pH 5.0 and of four strains at pH 4.5. At 50°C only two isolates did not grow at an initial pH of 7.0 or 6.0. At 50°C and an initial pH of 4.5, no strain was able to grow, but four isolates developed at the same temperature and an initial pH of 5.0. At 45°C, 50% of isolates grew at an initial pH of 7 after 1 week of incubation. Five out of these nine isolates, including the type strain, were also able to develop at 68°C and a pH of 7.0. At this temperature, the growth of three isolates was observed with an initial pH of 4.5. No growth was noticed, after 21 days of incubation, for any isolate at the minimal and maximal temperatures of 40°C and 70°C.

**Table 4: Ability of selected isolates of *Moorella* to grow at different antibiotics concentration**

| Strain number | Cycloserin                                 |   | Tetracyclin |    | Erythromycin |    | Ampicillin |    | Methicillin |     |    |   |   |    |    |    |
|---------------|--|---|-------------|----|--------------|----|------------|----|-------------|-----|----|---|---|----|----|----|
|               | Antibiotics concentration $\mu\text{g/mL}$ |   |             |    |              |    |            |    |             |     |    |   |   |    |    |    |
|               | 0  | 2 | 4           | 2  | 4            | 2  | 4          | 2  | 4           | 0.5 | 1  | 2 | 4 | 8  | 16 | 32 |
| 84            | 2  | 5 | 5           | ng | ng           | ng | ng         | 5  | 5           | 5   | 5  | 7 | 9 | 10 | ng |    |
| 91            | 2  | 5 | 5           | ng | ng           | ng | ng         | 5  | ng          | 5   | 5  | 7 | 9 | 10 | ng |    |
| 16            | 2  | 5 | 5           | 5  | ng           | ng | ng         | 5  | 5           | 5   | ng |   |   |    |    |    |
| 19            | 2  | 5 | 5           | 5  | ng           | ng | 5          | ng | 5           | 5   | ng |   |   |    |    |    |
| 35            | 2  | 5 | 5           | ng | ng           | ng | ng         | 5  | ng          | ng  |    |   |   |    |    |    |
| 10            | 2  | 5 | 5           | ng | ng           | ng | ng         | 5  | ng          | ng  |    |   |   |    |    |    |
| 58            | 5  | 5 | 5           | 5  | ng           | ng | 5          | ng | 5           | 5   | ng |   |   |    |    |    |
| 60            | 5  | 5 | 5           | ng | ng           | ng | ng         | 5  | 5           | ng  |    |   |   |    |    |    |
| 27            | 2  | 5 | 5           | ng | ng           | 5  | ng         | 5  | ng          | 5   | 5  | 7 | 9 | 9  | 15 | ng |
| 83            | 2  | 5 | 5           | ng | ng           | ng | ng         | 5  | 5           | ng  |    |   |   |    |    |    |
| 43            | 2  | 5 | 5           | 5  | ng           | ng | ng         | 5  | 5           | 5   | ng |   |   |    |    |    |
| 11            | 5  | 5 | 5           | 5  | ng           | ng | ng         | 5  | 5           | 5   | 5  | 7 | 9 | 10 | ng |    |
| 50            | 5  | 5 | 5           | ng | ng           | ng | ng         | 5  | ng          | ng  |    |   |   |    |    |    |
| 79            | 2  | 5 | 5           | ng | ng           | ng | ng         | 5  | 5           | ng  |    |   |   |    |    |    |
| 52            | 2  | 5 | 5           | ng | ng           | ng | ng         | 5  | 5           | 5   | 5  | 7 | 9 | ng |    |    |

Values are expressed in day.  
ng, no growth

#### • Antibiotic resistance

Antibiotics resistance was studied with the aim to find a specific medium for isolation of *Moorella* spp. Screening of 15 isolates of *M. thermoacetica/thermoautotrophica* was performed to determine their ability to grow in the presence of five antibiotics in DTB over two weeks (Table 4). Growth of most isolates displayed a delay in their growth when antibiotics were added to the medium. Cycloserin is generally added in Clostridia medium (TSC: 400 $\mu\text{g/ml}$ ) because clostridial species are naturally resistant. All isolates were resistant to cycloserin at the two concentrations tested. A low number of isolates grew at the lowest concentration (2 $\mu\text{g/ml}$ ) of tetracycline and erythromycin. Growth was noticed for seven out of 15 isolates in DTB containing 2 $\mu\text{g/ml}$  of methicillin. These three antibiotics, tetracycline, erythromycin and methicillin, could not be used to isolate *M. thermoacetica/thermoautotrophica* species because the majority of isolates tested were sensitive. Interestingly, the lowest ampicillin concentration did not inhibit the growth of any isolate. Thus, ampicillin could be used to select *M. thermoacetica/thermoautotrophica* species.

• *Spore heat resistance*

Heat resistance was evaluated at 130°C for spores produced at 55°C under anaerobiosis on Meat Liver medium supplemented with yeast extract at neutral pH (**Table 5**). A  $D_{130^{\circ}\text{C}}$  value, corresponding to the time necessary to reduce one logarithmic unit of the spore population at 130°C, was determined for each isolate. The D values were between 1.4 min and 6.6 min for the 19 isolates of *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica*. The two references strains used in this study displayed very different  $D_{130^{\circ}\text{C}}$  values: 2.4 min for DSM51 strain and 6.6 minutes for ATCC strain. Three isolates have  $D_{130^{\circ}\text{C}}$  values under the detection threshold and three have values lower than 2 minutes.

**Table 5: Heat resistance of spores produced in optimal conditions (55°C, pH 7) on VF SR medium**

| Strain number | D 130°C          |
|---------------|------------------|
| DSM521        | 2.4              |
| 91            | < 1 <sup>a</sup> |
| 16            | 3.8              |
| 19            | < 1 <sup>a</sup> |
| 35            | 3.0              |
| 10            | 2.5              |
| 58            | 1.7              |
| 30            | 2.5              |
| 60            | 2.2              |
| 32            | 1.4              |
| 27            | 2.0              |
| 83            | 1.9              |
| 43            | < 1 <sup>a</sup> |
| 11            | 2.3              |
| 50            | 2.1              |
| 79            | 4.9              |
| 38            | 2.8              |
| 52            | 5.7              |
| ATCC39073     | 6.6              |

<sup>a</sup> at least 4 logs of destruction in 1 minute



## 2.5 Discussion

The goal of this study was to evaluate the genetic diversity among a large panel of *M. thermoacetica/thermoautotrophica* and subsequently some physiological characteristics in order to have a better knowledge about the main species responsible for canned food spoilage at high temperature.

Two typing methods, M13-PCR and MLVA, were both applied on a subset of 72 *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates from spoiled canned foods. The two methods target different regions in the genome. The M13-PCR method targets the sequence of the M13 coliphage randomly inserted throughout the genome whereas MLVA uses specific primers in the flanking regions of tandem repeats mainly located in non-coding regions. Although the functions of these interspersed repetitive DNA elements remain unknown, their presence is useful for DNA fingerprinting of bacteria because they are known to be an important source of genetic polymorphism (Fournier *et al.*, 2004). Both M13-PCR and MLVA typing methods showed an important diversity among strains studied. A common feature between both methods was the detection of many independent profile-types and groups with few isolates. However, most of genetic groups formed with the two methods did not overlap. This indicates that the genetic features targeted by each method are not necessarily linked through the evolution of the observed diversity (Dhakal *et al.*, 2013).

Most of the strains gathered in a same group whatever the method used did not share a common origin. However, the two methods can be compared for their ability to link isolates with the same origin. M13-PCR resulted in the same profile-type for nine couples of strains, including one couple not tested by MLVA. MLVA resulted in the same profile-type for seven couples of strains. Among them, four couples were put in the same group whatever the method. For this aspect, the two methods were thus equivalents.

The relationship between genetic group and origin of isolates is not the rule. Indeed, if a good correlation between groups and their origin was shown for *B. cereus* isolates from dehydrated ingredients, it was related to a selective pressure (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003).

On the opposite, MLVA genotyping of 46 *Geobacillus* spp. strains showed that genotypes were ubiquitous across processing plants from several countries (Seale *et al.*, 2012). Similarly, the clustering of MLVA genotype of dairy *Bacillus licheniformis* isolates indicated no specific grouping from specific processing plants or retailed milk samples (Dhakal *et al.*, 2013).

The number of VNTR loci that were discriminatory for *M. thermoacetica/thermoautotrophica* genotyping was only two in our study. Some authors used either a single locus (Naze *et al.*, 2010) or up to 25 loci (Lista *et al.*, 2006) while others had mainly used between 5 and 15 loci (Keim *et al.*, 2000; Le Fleche *et al.*, 2001; Le Fleche *et al.*, 2006; van den Berg *et al.*, 2007; Dhakal *et al.*, 2013). This method has been frequently used for monomorphic organisms such as *Bacillus anthracis* and *Escherichia coli* O157 (Lista *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2013b) or for detecting epidemiological clusters such as in *Clostridium difficile* and *Salmonella* spp. (Lindstedt, 2005). MLVA was generally applied for genomes showing similarities above 98% (Grissa *et al.*, 2008). This method has been never tested on *Moorella* spp. neither on other thermophilic anaerobic sporeforming bacteria. This method presents several advantages such as application on a mixture of strains as it triggers species specific DNA regions. As *M. thermoacetica/thermoautotrophica* is difficult to isolate, the possibility to apply a genotyping method without any isolation step present many advantages to understand contamination paths within food processing plants.

A study performed on six *Moorella* spp. strains isolated from spoiled cans using 16S rRNA sequence analysis, 16S–23S rRNA intergenic spacer region sequences and DNA-DNA hybridization did not succeed to discriminate *M. thermoacetica* from *M. thermoautotrophica* (Carlier *et al.*, 2006). In contrast to these methods, both M13-PCR and MLVA would provide a high discriminative power. To assess that possibility, our study should be complete with additional references strains including *M. thermoautotrophica* and other *Moorella* species type strains.

To determine if the observed genetic diversity is related to a diversity of physiological properties of isolates, 19 isolates were characterized for their growth temperatures and pH, spore heat resistance and antibiotic sensitivity. Optimal temperatures (55°C-65°C) and pH (5.5-7) determined in our study for *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates from spoiled canned foods were consistent with already observed values for strains isolated from autoclaved media, spoiled canned fish soups and cooked meats (Fontaine *et al.*, 1942; Byrer *et al.*, 2000; Carlier *et al.*, 2006). Extreme temperatures (45°C-68°C) and minimal pH (below 4.5) for growth of *M. thermoacetica/thermoautotrophica* were established in our study. The minimal pH for growth of the type strain (DSM521) obtained with glucose as main carbon source was  $5.5 \pm 0.1$  as previously described (Collins *et al.*, 1994). Maximal growth temperature at 68°C for this strain is slightly higher than previously published value. Authors noticed a difference in maximal temperature for growth between the two species, *M. thermoacetica* grew at 65°C but not at 70°C unlike to *M. thermoautotrophica* (DSM 19174)

(Fontaine *et al.*, 1942; Wiegel *et al.*, 1981; Byrer *et al.*, 2000; Carlier *et al.*, 2006). Moreover, growth at pH below 5.0 was never observed for *M. thermoacetica* but rather for *M. thermoautotrophica* isolates (Wiegel *et al.*, 1981; Collins *et al.*, 1994; Balk *et al.*, 2003). However, these two parameters, temperatures and pH, were not enough to attribute an isolate to one unique species. As suggested by Wiegel (Wiegel *et al.*, 1981; Wiegel *et al.*, 1991), the two species do not exhibit the same tolerance to calcium chloride. This could be tested for the strains used in our study.

Antibiotics resistance could be used to develop a medium selective for enrichment and/or isolation of *M. thermoacetica/thermoautotrophica*. From our results, knowledge about ampicillin resistance of other thermophilic species which contaminate the same ecological niches together with *M. thermoacetica/thermoautotrophica* species such as *Geobacillus* spp. and *Thermoanaerobacterium* spp. is necessary. Further work is running in our laboratory to that aim.

Data collected in this study would help to control the contamination by *M. thermoacetica/thermoautotrophica* on food processing lines. Growth temperature ranges can be encountered in vegetable canneries, mainly after bleaching step and before brining. The temperature and pH range for spore formation is the same than for bacterial growth (Baril *et al.*, 2012). Sporulation is a major problem in food industry especially for these species which have an extremely high heat resistance ( $D_{130^{\circ}\text{C}}$  from 1.4 to 6.6 min) regarding possible food thermal treatments that preserve sensorial properties of food. In *Bacilli* and *Clostridia*, sporulation temperature has a significant effect on heat resistance (Garcia-Alvarado *et al.*, 1992; Planchon *et al.*, 2010). Indeed, spores formed at low temperature are less heat resistant than spores formed at high temperature. Sporulation in other conditions is in progress in our lab and mainly for the lowest and the highest temperature. In our study, D values obtained for spores of *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates from spoiled canned foods were close to previously published values. For thermophilic endospore forming bacteria, the z value, corresponding to temperature difference to change the D value by a tenfold factor, is close to 8°C (mean z value for 3 *Moorella* strains) (André *et al.*, 2013). Taking account this z value, our  $D_{130^{\circ}\text{C}}$  values would be between 14 min and 66 minutes at 122°C. In the literature, spores of *M. thermoacetica* formed in optimal conditions (60°C, pH 6) displayed  $D_{121^{\circ}\text{C}}$  values between 38 and 44 min with chemoorganoheterotrophical growth (with glucose) and between 83 and 111 min with chemoorganolithoautotrophical growth (with sodium carbonate) (Byrer *et al.*, 2000). They are among the most heat resistant in food industry compare to other thermophilic species. Another species, *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*,

encountered in spoiled canned foods with *M. thermoacetica/thermoautotrophica*, have comparable heat resistance values ( $D_{124^{\circ}\text{C}}$  of 72.5 min). Sporulation conditions (temperature, pH, medium, and atmosphere) used in our study were completely different of those used by Byrer (2000) and could explain spore heat resistance difference. The increase of sterilization values to destroy spores that display heat resistance of several minutes at  $130^{\circ}\text{C}$  is not possible. Another way to limit spoilage risk is to impair spore germination and further growth of vegetative cells. A pH decrease of food is a method often used, the best example being acidic canned food to prevent *Clostridium botulinum* pathogen risk (Peck *et al.*, 2011). In our study, 14 out of 18 *M. thermoacetica/thermoautotrophica* isolates can grow at pH 4.5. Our data require to be completed with assays to determine the lowest pH allowing growth of *M. thermoacetica*. But the food pH decrease is not promising to prevent the spoilage risk related to *M. thermoacetica/thermoautotrophica*.

The limitation of canned food spoilage risk by *Moorella* spp. cannot be achieved by pH decrease of the product and/or increase of heat treatment. Consequently, actions must be carried out before heat treatment either using sporicides such as Peracetic acid (PAA) or by triggering spore germination. Currently, the national agency for food safety gives authorization to wash spinaches with PAA in order to reduce microbial charge (Avis de l'ANSES, Saisine n°2012-SA-0107), thus vegetables contaminated by *Moorella* spores could be treated with PAA. Moreover, efficiency of PAA has already been confirmed on *M. thermoacetica/thermoautotrophica* spores (André S. 2012). Germination ability depends on activation step which was determined between 5 to 90 minutes at  $100^{\circ}\text{C}$  for *M. thermoacetica* species. This step can take place in food processing line during bleaching but residence time is not controlled in food industry. In some cases, first step of germination can occur in anaerobic condition such as in juice before heat treatment. As others bacteria, *M. thermoacetica* genome contains toxins encoding genes (Kegg Brite) which could be or not expressed during growth. Because these species need anaerobic conditions for their growth, waiting time before heat treatment will never be sufficient to allow their development.

### **Acknowledgments**

This work forms part of author Loïc Durand's PhD thesis. He received a grant from the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie*, Paris, France. The research work was supported by France AgriMer and by the Conseil Regional Provence-Alpes-Côte d'Azur (DIVERSITHER project).



## Chapitre 5

### 1. Les voies de contamination des bactéries formant des spores sur une ligne de production de légumes dans une conserverie française

#### 1.1 Objectifs et méthodologie

L'altération des conserves peu acides est principalement due à la survie des spores bactériennes aux traitements thermiques, suivie de leur développement dans l'aliment. La résistance des spores aux opérations unitaires appliquées pendant les différentes étapes du procédé de fabrication entraîne leur survie jusque dans le produit fini. Les tests de stabilité ont montré que les bactéries thermophiles étaient la principale cause d'altération des conserves. Leurs spores résistent à des températures supérieures à 100°C pendant plus de 10 minutes. Les spores hautement thermorésistantes sont définies comme capables de résister à des températures de 106°C et plus. Les sources de contamination sont multiples et les sols sont des réservoirs de spores bien connus (Carlin, 2011). Après leur entrée dans l'usine, les spores peuvent persister sur les lignes de production en raison des températures élevées nécessaires à la transformation des produits, lesquelles peuvent être favorables à la multiplication et à la sporulation bactérienne. Ainsi, une meilleure connaissance des voies de contaminations sur les lignes de production y compris des zones favorables à la multiplication et à la sporulation bactérienne était nécessaire. L'objectif de cette étude était de déterminer les niveaux de contamination en spores de bactéries anaérobies thermophiles, thermorésistantes et hautement thermorésistantes, à différentes étapes d'une ligne de transformation de petits pois carotte. Les trois espèces thermophiles *G. stearothermophilus*, *Thermoanaerobacterium* spp. et *M. thermoacetica/thermoautotrophica* ont été recherchées dans tous les échantillons.

#### 1.2 Principaux résultats

Au cours de deux campagnes successives de production de conserves de petit pois, 341 échantillons ont été prélevés sur une unique ligne de transformation en Bretagne, entre l'arrivée des matières premières et la boîte juste avant traitement thermique. Le dénombrement des spores de bactéries thermophiles et la détection spécifique des trois

espèces de thermophiles les plus fréquentes ont été appliqués. La méthode de typage M13-PCR a été appliquée sur 112 isolats de *G. stearothermophilus* isolées de ces échantillons. Un total de 23 profil-types a été obtenu contenant neuf groupes et 14 profil-types indépendant.

Les résultats ont permis de confirmer que la contamination majoritaire provient des légumes issus du champ et que la préparation des légumes contribue significativement à diminuer le nombre de spores. Leurs concentrations variaient de  $10^4$  à  $10^0$  UFC/g entre les légumes à la réception de l'usine et ceux juste après l'étape de blanchiment. Deux zones sur la ligne de transformation sont apparues comme cruciales. Le blanchiment permet de diminuer le niveau de spores mais favorise la contamination croisée des isolats et une persistance des espèces formant des spores hautement thermorésistantes. Les débris hors du flux de transformation conduisent à des augmentations ponctuelles du nombre de spores dans les produits en fin de transformation. L'ensemble des résultats permet de proposer des actions visant à mieux maîtriser le risque de non-stabilité des conserves telles que la décontamination en continu de l'eau de blanchiment pendant la production, la surveillance des zones d'accumulation de débris sur les tapis de convoyages et le maintien d'une température élevée tout le long du procédé pour éviter le développement et la sporulation des bactéries formant des spores.

## 2. Article 3: Contamination pathways of spore-forming bacteria in a vegetable cannery

Loïc DURAND, Stella PLANCHON, Marie-Hélène GUINEBRETIERE, Stéphane ANDRE, Frédéric CARLIN, Fabienne REMIZE

*Article à soumettre dans la revue scientifique International Journal of Food Microbiology*

### 2.1 Abstract

---

Spoilage cases of low-acid canned food during prolonged storage at high temperatures are caused by resistance to heat treatment of thermophilic bacteria spores. A processing line of a French company manufacturing canned mixed green peas and carrots was surveyed during two consecutive years. A total of 341 samples, including raw vegetables, green peas and carrots at different steps of processing, covering brine and process environment samples were collected. Thermophilic anaerobic spores and highly-heat-resistant thermophilic anaerobic spores were counted and the prevalence of the three most heat-resistant species involved in spoilage was determined. Anaerobic spore counts significantly decreased during vegetables preparation by washing, pea blanching and peeling of carrots but remained on average constant thereafter in the process. Occasional high levels of spores in out-of-flow samples and surfaces, combined with growth and sporulation suitable conditions and with long residence time, could explain the large variation of spore levels in the product just before preservation heat treatment. Vegetable processing resulted in the same time in an increase of prevalence of highly heat resistant species, probably due to cross-contamination of peas during blanching step. In addition, *G. stearothermophilus* genotypic profiling by M13-PCR was applied on 112 isolates. It showed a selection of genotypic groups by the process as the most frequent groups differed between blanching step samples, out-of-flow transferred samples and in-flow canned vegetables. All together these data clarify contamination paths by thermophilic spore forming bacteria in a vegetable cannery.

---

**Keywords:** canned food, heat-resistance, spore, thermophile, *Geobacillus stearothermophilus*, *Moorella thermoacetica*



## 2.2 Introduction

Sealed and sterilized canned vegetables are microbiologically stable for years at ambient temperature, because of heat inactivation of mesophilic microorganisms. Spoilage in low-acid canned vegetables (pH greater than 4.5) occurs mainly at high incubation temperature (> 40°C) and is caused by the survival of thermophilic spore-forming bacteria and further multiplication. These bacteria are not known to be pathogenic to humans, but they are considered as an industrial risk, which needs to be controlled by canning industries. For instance the stability test after incubation at 55 °C for 7 days (French standard NF V08-408 (AFNOR, 1997b)) of canned foods is used as a hygiene indicator and as a norm for exportation to hot-climate regions as European regulation requires that food is safe and wholesome for trading. The percentage of non-stability of canned vegetables has been estimated at approx. 1.5 % in a survey done in French canning industries (Rigaux et al., 2013). *Geobacillus stearothermophilus*, *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* and *Thermoanaerobacterium* spp. are regularly identified as the most common cause of low-acid spoilage of canned foods, including canned vegetables, representing up to 75% of the species responsible for non-stability at 55°C (Ashton and Bernard, 1992; Dotzauer *et al.*, 2002; Carlier and Bedora-Faure, 2006; Carlier *et al.*, 2006). These bacteria share a high heat resistance, with D-values (decimal reduction times) at 121°C greater than 1 min for *G. stearothermophilus* in most instances and up to 111 min for *M. thermoacetica* (Matsuda *et al.*, 1982; Byrer *et al.*, 2000; André *et al.*, 2013). Other moderately thermophilic bacteria, such as *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Anoxybacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Thermoanaerobacter* spp. and *Clostridium thermobutyricum/thermopalmarium*, able to survive heat-treatment at temperatures greater than 100°C for 10 min, are also identified as canned food spoilage microorganisms (Feig and Stersky, 1981; Raso *et al.*, 1995; André *et al.*, 2013).

Sources of contamination of food processing facilities are diverse (Carlin, 2011). Soil and natural environments are reservoirs of spore-forming bacteria (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003; Groenewald *et al.*, 2009; Logan and De Vos, 2009; Zeigler, 2014). Spore contamination into food processing facilities comes with soil dust in open areas, adhesion to unprocessed food material or carriage by employees (Groenewald *et al.*, 2009; Sevenier *et al.*, 2012). The canning process of vegetables combines several operations allowing contamination with micro-organisms. Freshly harvested vegetables are washed, trimmed and cut, then blanched by steaming or dipping into hot water for a few min at temperatures close to 100°C, before can filling with addition of a hot covering brine and further sterilization.

Between blanching and sterilization, vegetables are maintained at relatively high temperatures that may allow thermophilic bacteria growth and eventually sporulation. Moreover, spore adhesion to industrial materials and spore resistance to cleaning and disinfection favor their persistence along the chain. Spore release may be differed in time and cross-contamination may emerge long after initial contamination (Tauveron *et al.*, 2006; Seale *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2009; André *et al.*, 2012). A better understanding of contamination pathways and possibilities of spore formation was therefore necessary for control of contamination in the processing chain.

Classical and molecular methods to detect and to quantify spore-forming bacteria from processing lines have been proposed (Prevost *et al.*, 2010; Postollec *et al.*, 2012). Typing of *B. cereus* strains isolated at different steps in a processing line of zucchini purée was realized by M13 sequence-based PCR (M13-PCR, an amplification method deriving from RAPD, for Random Amplified Polymorphic DNA), (Guinebretiere *et al.*, 2003; Guinebretiere and Nguyen-The, 2003). Strains were clustered according to their genetic fingerprint and contamination pathways were successfully identified: soil was a major initial source of contamination of zucchinis but ingredients such as milk proteins and starch did not contribute to the contamination of the product when properly stored at cold temperatures. Applied to *B. licheniformis* thermophilic isolates from milk powder processing line samples and commercial retail samples, the three genotyping methods RAPD, *rpoB* sequencing and MLVA established that this bacterium derives from factory external sources and is not subjected to significant clonal selection within processing plants (Dhakal *et al.*, 2013).

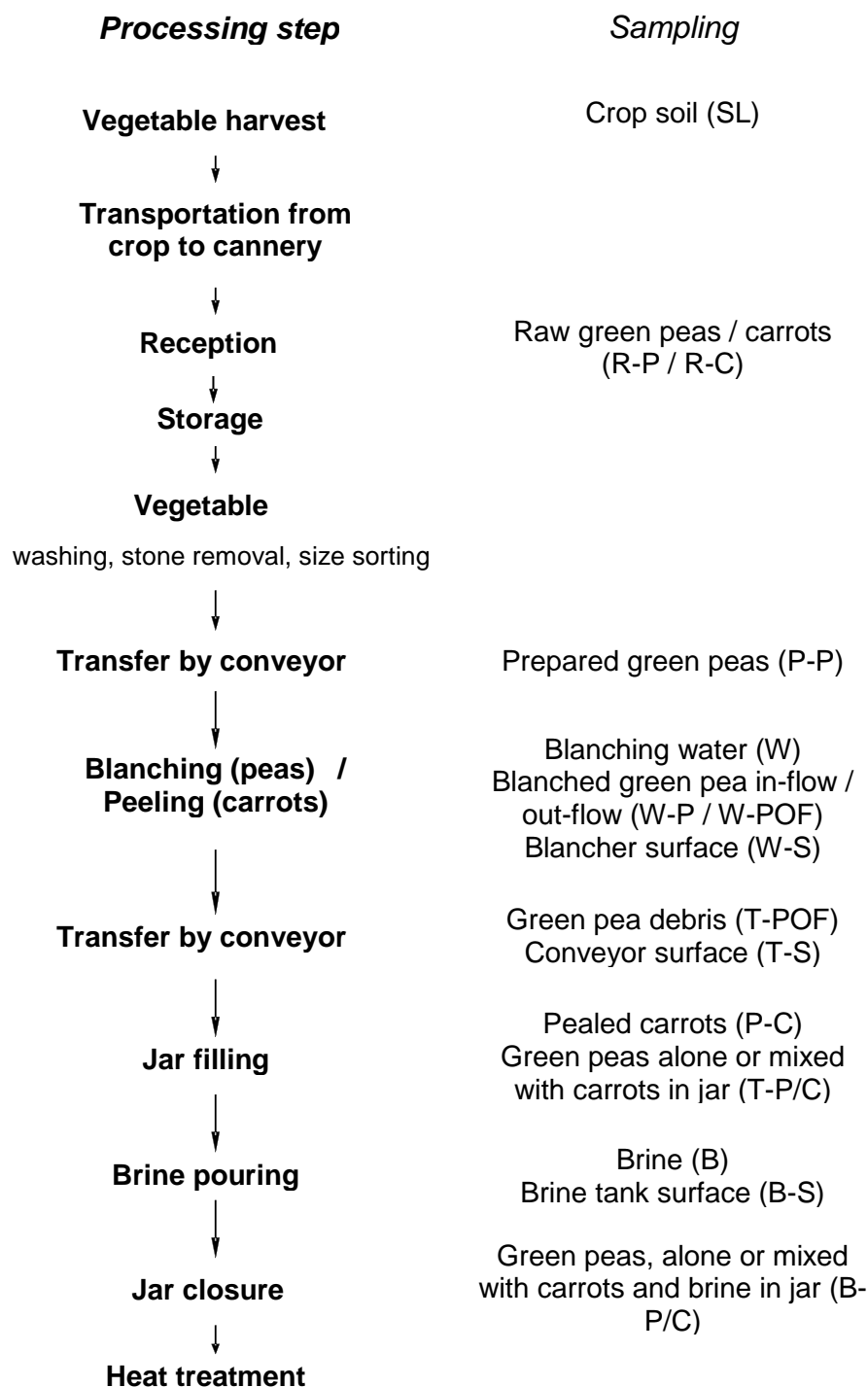
The aim of this work was to determine changes in population levels of thermophilic spore-forming bacteria at different steps of the processing chain of a canned green peas and carrot process. Thermophilic species the most frequently involved in spoilage were specifically looked for. Then we focused on *G. stearotherophilus* isolates and applied M13-PCR typing, previously described for genetic group differentiation in this species (Durand *et al.*, 2014) to clarify contamination pathways.

## 2.3 Material and methods

### 2.3.1 Sampling

A total of 341 samples (263 in 2011 and 78 in 2012) aimed to microbiological analyses were collected near or in a Western France processing plant during June and July 2011 and 2012. Nine soil samples (SL) were collected during the production period from the crops of

green peas aimed at processing. The 332 others were collected at a French cannery producing canned green peas and canned green peas and carrot mix. These samples include vegetables at different steps of processing (**Figure 1**), process liquids and surface samples from processing equipment.



**Figure 1: Flow diagram describing the processing steps for green peas and carrots in the surveyed vegetable cannery**

Raw unprocessed green peas were washed by successive immersion in water, then blanched in hot water (95°C) and conveyed for filling into cans. Carrots are washed with water, peeled, and then added to cans previously partially filled with green peas. At this stage, covering brine (ca. 2% salt and 2% sugar in water) is poured into the filled cans. Cans are sealed and then sterilized by heat with an equivalent heating time at 121°C  $F_0$  of >20 min before further storage at ambient temperature. Solid and liquid samples were collected with sterile instruments and directly poured into sterile plastic vials. Surface of approximately 100 cm<sup>2</sup> were wiped with sterile dry sponges moistened with 10 mL of thinner pharmacopoeia sodium thiosulfate (VWR BDH Prolabo, Fontenay-sous-bois, France). The number of samples and corresponding sampling stages are presented in **Table 1**. Raw green peas (R-P) and raw carrots (R-C) were sampled at the reception deck. Prepared green peas (P-P) were collected immediately before blanching. Blanched green peas were sampled immediately after blanching together with blanching water (W), in the processing flow (W-P) and out of flow as lateral debris (W-P-OF), and further during transfer on the conveyor as lateral debris (T-P-OF). Peeled carrots (P-C) were separately sampled immediately before filling. Both green peas and carrots were collected at the filling machine (T-P/C), and again after addition of the covering brine (B) immediately before sterilization (B-P/C). The covering brine (B) was separately sampled; from the excess brine which was collected back to the brine tank. The temperature of each sample was recorded in 2011 with a digital thermometer (EcoScan Temp5, Fisher, Illkirch, France) immediately after sampling. Mean temperatures are listed in **Table 1**. Samples were collected three times a day, i.e. at the beginning of the processing day (approx. 9-10 am), in the middle (between 2 pm and 3 pm) and one hour before the processing stops (approx. 9 pm). Surface samples were collected on the wall of the blancher (W-S), on the conveyor belts used for transfer (T-S) and on the wall of the tank of covering brine (B-S). This surface sample collection took place after the production of the day and immediately before processing line cleaning. During the 1-month production period, nine samples of soil (SL) were collected from cultivated crops of green peas. All samples were stored at 4°C immediately after collection and received refrigerated at the laboratory within two days. They were then frozen and stored at -20°C until final analysis.

**Table 1: List and number of samples subjected to microbiological analyses and temperature measurements, collected in 2011 and 2012 along the processing chain of canned vegetables, and temperatures recorded in 2011**

| Sample  | Sample code | 2011 number of collected samples | 2012 number of collected samples | 2011 temperature (mean $\pm$ SD) <sup>a</sup> |
|---|-------------|----------------------------------|----------------------------------|---|
| Soil of the green peas crop   | SL          | 8                                |                                  | 25.4 $\pm$ 2.5                                |
| Raw carrots (reception desk)  | R-C         | 16                               |                                  | 22.6 $\pm$ 0.4                                |
| Peeled carrots  | P-C         | 12                               |                                  | nd  |
| Raw green peas (reception desk)   | R-P         | 22                               |                                  | 25.2 $\pm$ 1.7                                |
| Prepared green peas   | P-P         | 22                               | 13                               | 17.9 $\pm$ 1.1                                |
| Blanching water   | W           | 23                               | 13                               | 85.7 $\pm$ 1.1                                |
| Blanched green peas in-flow   | W-P         | 22                               | 13                               | 83.9 $\pm$ 4.7                                |
| Blanched green peas out-of-flow   | W-POF       | 22                               |                                  | 46.6 $\pm$ 5.3                                |
| Blancher surface  | W-S         | 8                                |                                  | nd  |
| Green peas debris on conveyor   | T-POF       | 23                               | 13                               | 41.8 $\pm$ 9.2                                |
| Conveyor belt surface   | T-S         | 8                                |                                  | nd  |
| Green peas, alone or mixed with carrots, transferred to can filling machine | T-P/C       | 23                               |                                  | 43.1 $\pm$ 6.6                                |
| Brine   | B           | 23                               | 13                               | 69.3 $\pm$ 7.3                                |
| Brine tank surface  | B-S         | 8                                |                                  | nd  |
| Green peas, alone or mixed with carrots, in cans with covering brine        | B-P/C       | 23                               | 13                               | 50.2 $\pm$ 4.3                                |

<sup>a</sup> Mean  $\pm$  standard deviation. The temperature was measured in the center of the sample immediately after collection. nd: not determined

### 2.3.2 Sample preparation for microbiological analysis

Samples were thawed at 4°C one day before assay. A quantity of 10 g of solid samples were mixed to 90 ml of Rosenow broth (modified by supplementation with 1 g/L starch, 3 g/90mL marble and 3 g/90mL brain extract) (mRB) (BioRad, Marnes-la-Coquette, France) in a sterile BagFilter™ (Interscience, Saint Nom, France). Diluted samples were homogenized for 30 seconds using a BagMixer™ (Interscience). The BagFilter™ filtrate was used for further enumeration and detection of target microorganisms. Liquid samples were used directly. Sponges used for surface sampling were placed in sterile bags and covered with 90 mL mRB, then homogenized for 30 s. Filtrate was recovered after wringing manually the sponge.

### 2.3.3 Anaerobic spore counts

An aliquot fraction of sample filtrate was placed in a sealed glass 2.2 mL ampoule and heat-treated for 10 min at 106°C in a temperature-regulated oil bath for the selection of Highly Heat-Resistant (HHR) thermophilic spores. Another fraction was poured into an 1.7 mL Eppendorf tube and heat-treated for 10 min at 100°C in a Stuart® SBH130DC Digital Block Heater (Bibby Scientific, Staffordshire, United Kingdom) for the selection of spores of thermophilic bacteria .

Serial dilutions of heat-treated samples in tryptone salt broth were plated (1 mL) on meat liver glucose agar modified by supplementation with 2 g/L yeast extract (Biokar Diagnostic, Beauvais, France) (mMLGA). Plates were incubated at 55°C during 5 days in anaerobic jars using Genbox anaer generators (Biomerieux, Craponne, France). Spore counts were calculated with a detection threshold of 10 TAS/g (TAS for thermophilic anaerobic spores) and 10 HHR TAS/g for solid samples, 1 TAS/mL and 1 HHR TAS/mL for liquid samples and 1 TAS/cm<sup>2</sup> and 1 HHR TAS/cm<sup>2</sup> for surface samples.

### 2.3.4 Prevalence of *Geobacillus stearothermophilus*, *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica* and *Thermoanaerobacterium* spp

Samples diluted in mRB were further incubated during 4 days at 55°C for enrichment. A volume of 1 mL of the sample was then used to extract total DNA with the InstaGene™ (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) matrix following manufacturer's instructions. Specific detection of *G. stearothermophilus*, *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* or *Thermoanaerobacterium* spp was performed with the specific PCR technique SporeTraQ™, as previously developed (Sevenier et al., 2012). Briefly this method amplifies a DNA region corresponding to rRNA internal transcribed sequence 16S-23S. The sizes of amplification product were 302 pb, 467 pb and 487 pb corresponding to *G. stearothermophilus*, *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* and *Thermoanaerobacterium* spp. respectively. All amplification steps were performed in a total volume of 25 µL with a GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). PCR products were directly analyzed by electrophoresis in TAE (Tris-Acetate-EDTA buffer) 1% agarose gel. This method of extraction/amplification allows a detection threshold of 10 spores per ml of enrichment broth (Prevost et al., 2010). The threshold of detection was estimated at one spore per g of sample subjected to enrichment (Sevenier et al., 2012).

### 2.3.5 *G. stearothermophilus* M13-PCR typing

Isolation of *G. stearothermophilus* strains was performed from samples tested positive with SporeTraQ™. A droplet (10µL) of the positive sample was deposited on the surface of bromocresol purple (BCP) and incubated 24 h at 55°C. Several colonies were isolated on BCP and incubated for 24 h at 55°C. One loopful of bacterial isolate was used to extract total DNA with the InstaGene™ (Bio-Rad) matrix following manufacturer's instructions. Specific detection of *G. stearothermophilus* was performed by SporeTraQ™ PCR as described above. Then, DNA of bacterial strains confirmed as *G. stearothermophilus* was extracted with chloroform/phenol as described previously with the following modifications (Guinebretiere and Nguyen-The, 2003). Two loops of cells were suspended in 550 µL extraction buffer (1.7% sodium dodecyl sulfate, 200 mM Tris-HCl (pH 8), 20 mM EDTA, 200 mM NaCl) and the suspension was incubated at 55°C for 30 min instead of 55°C for 60 min. Two successive phenol extraction steps were performed instead of one step. Finally, DNA was dissolved in 50 µL sterile Milli-Q water, and stored at -20°C. DNA was quantified by A<sub>260</sub> (NanoQuant Plate™ Infinite® M200, Tecan Austria). From extracted DNA, M13-PCR typing was adapted from the protocol described by Guinebretiere and Nguyen-The (2003) for *Bacillus cereus*. The specific primer sequence was PM13: 5'-GAGGGTGGCGGCTCT-3'. PCR mixture (25 µL) contained 25 ng of DNA template, 4.8 mM primer (Eurogentec S.A., Seraing, Belgium), 1.25 mM dNTPs mix (Eurogentec), 6 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 10% (vol/vol) dimethyl sulfoxide, 1.5 U of Diamond Taq® DNA polymerase (Eurogentec) and 1X of buffer. PCR amplifications were done in a GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA). PCR cycling parameters included a denaturation step at 94°C for 3 min followed by 35 cycles each consisting of 94°C for 1 min, 40°C for 1 min and 68°C for 8 min; and a final extension step at 68°C for 16 min. A negative control containing Milli-Q water instead of DNA and a positive control, the DNA of *B. cereus* strain ATCC 14579 producing a known banding pattern were included in each PCR experiment. A *G. stearothermophilus* isolate recovered from a spoiled green pea can in 2010 was included in the panel and labelled #124.

PCR products from M13-PCR were separated by electrophoresis on 1.5% agarose-gels in 0.5X TBE buffer (20 mM Tris, 10 mM acetic acid, 0,5 mM EDTA, pH 8). The molecular mass DNA marker Smart Ladder (Eurogentec) was used. Gels were stained with ethidium bromide and digitized on a UV gel imager (Molecular Imager® Gel Doc™ XR System 170-8170, BioRad, France). A dendrogram was constructed from the similarity of M13-PCR banding pattern (Dice's coefficient) and using the Unweighted Pair Group Method with

Arithmetic mean (UPGMA). Band detection, similarity coefficient and dendrogram were obtained with the BioGene 99.04 software (Vilber Lourmat, Marne la Vallée, France). The confidence interval on band size was adjusted to obtain 100% similarity between experimental replicates of control strains. The similarity threshold was adjusted so as to obtain the maximum of robustness for genetic group formation.

### *2.3.6 Statistical analyses*

All statistical analyses were carried out with the software XLSTAT (Addinsoft™, Paris, France). Numeration data below detection threshold were set to threshold divided by square root of two (Hornung and Reed, 1990). P-value was set at 0.05.

Variation among replicates was expressed with standard deviation. A Bonferroni test was applied to detect significant differences between means. For proportions, the confidence interval was determined as the value corresponding to 1.96 standard deviations. Proportion comparisons were performed according to Fleiss (2004).

## **2.4 Results**

### *2.4.1 Enumeration of thermophilic anaerobic spores (TAS) and highly-heat-resistant (HHR) TAS*

Thermophilic anaerobic spores (TAS) and highly-heat-resistant (HHR) TAS were enumerated in all samples collected in 2011 and 2012 (**Table 2** and **Figure. 2**).

The 2011 highest TAS count means were in soil (SL) and raw carrots (R-C), with  $3.2 \pm 0.5$  log cfu/g and  $3.1 \pm 1.0$  log cfu/g respectively. Globally HHR TAS counts were lower than TAS, but the highest HHR TAS were also in SL and R-C samples, at  $2.7 \pm 0.2$  log cfu/g and  $2.3 \pm 0.8$  log cfu/g respectively. These population levels significantly differed from other counts. Raw pea (R-P) TAS and HHR TAS populations ( $2.0 \pm 0.4$  log cfu/g and  $1.2 \pm 0.5$  log cfu/g, respectively) significantly differed ( $P < 0.05$ ) from soil samples and raw carrots.



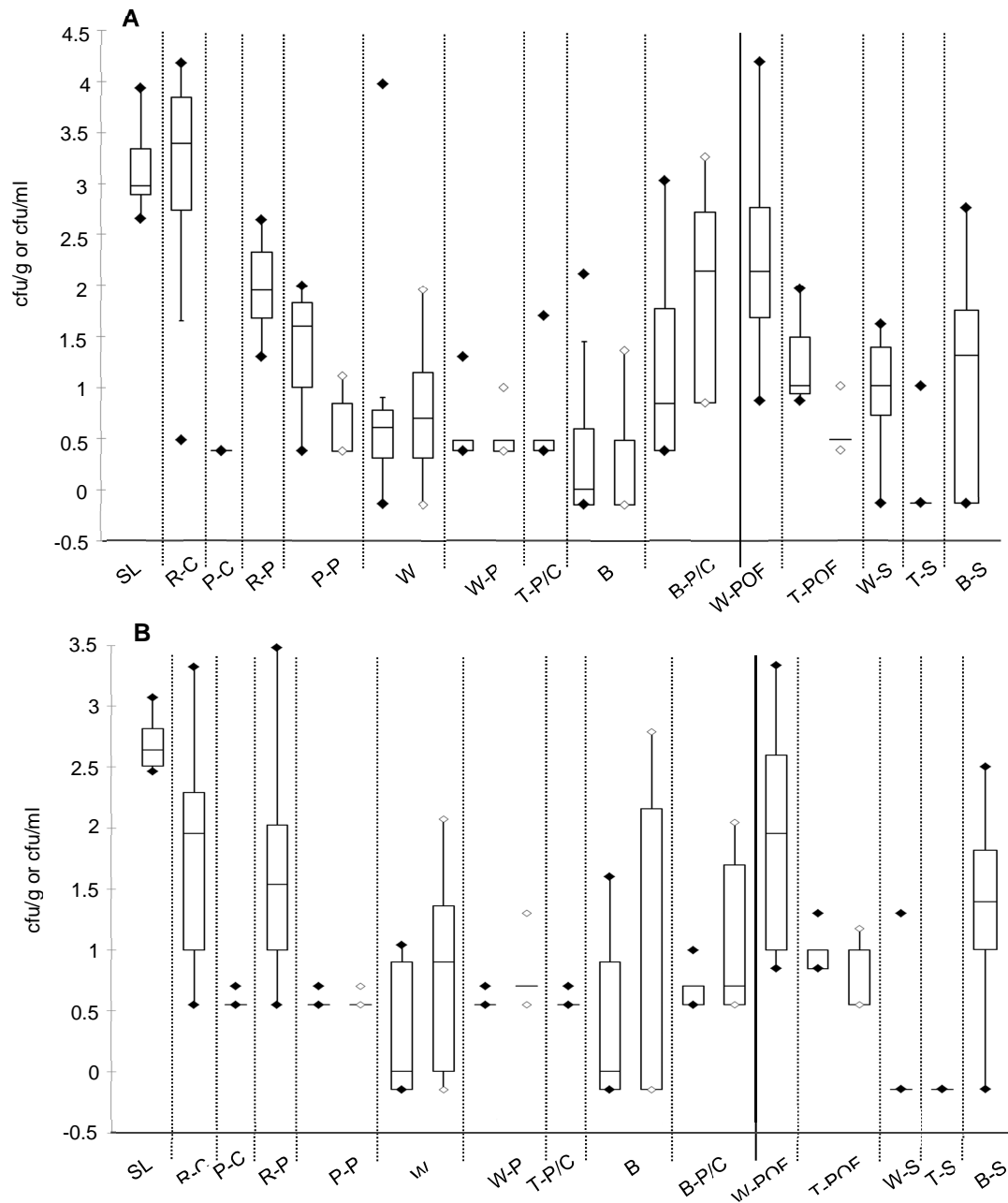
**Table 2: Thermophilic anaerobic spore (TAS) and highly-heat-resistant (HHR) TAS counts from vegetable samples collected in 2011 and 2012 from the processing chain of canned vegetables**

| Sample <sup>a</sup> | TAS (log cfu/g or ml or cm <sup>2</sup> ) <sup>b</sup> |           |                                   | HHR TAS (log cfu/g or ml or cm <sup>2</sup> ) <sup>b</sup> |           |                                   |
|---------------------|--|-----------|-----------------------------------|--|-----------|-----------------------------------|
|                     | 2011 mean  | 2012 mean | 2011/2012 comparison <sup>c</sup> | 2011 mean  | 2012 mean | 2011/2012 comparison <sup>c</sup> |
| SL                  | 3.2 (A)  | nt        |                                   | 2.7 (A)  | nt        |                                   |
| R-C                 | 3.1 (A)  | nt        |                                   | 2.3 (AB)   | nt        |                                   |
| P-C                 | 0.4 (E)  | nt        |                                   | 0.5 (EF)   | nt        |                                   |
| R-P                 | 2.0 (BC)   | nt        |                                   | 1.2 (D)  | nt        |                                   |
| P-P                 | 1.3 (CD)   | 0.58 (A)  | S                                 | 0.6 (EF)   | 0.6 (A)   | NS                                |
| W                   | 0.5 (E)  | 0.7 (A)   | NS                                | 0.4 (F)  | 0.8 (A)   | S                                 |
| W-P                 | 0.5 (E)  | 0.5 (A)   | NS                                | 0.6 (EF)   | 0.8 (A)   | S                                 |
| W-POF               | 2.4 (AB)   | nt        |                                   | 2.0 (BC)   | nt        |                                   |
| W-S                 | 0.9 (DE)   | nt        |                                   | 0.1 (F)  | nt        |                                   |
| T-POF               | 1.2 (D)  | 0.5 (A)   | S                                 | 0.9 (DE)   | 0.7 (A)   | S                                 |
| T-S                 | -0.1 (F)   | nt        |                                   | -0.1 (G)   | nt        |                                   |
| T-P/C               | 0.5 (E)  | nt        |                                   | 0.6 (EF)   | nt        |                                   |
| B                   | 0.3 (E)  | 0.2 (A)   | NS                                | 0.3 (F)  | 0.8 (A)   | NS                                |
| B-S                 | 1.1 (DE)   | nt        |                                   | 1.4 (CD)   | nt        |                                   |
| B-P/C               | 1.0 (DE)   | 1.8 (B)   | NS                                | 0.6 (EF)   | 1.1 (A)   | S                                 |

<sup>a</sup> The different samples were SL, Soil; R-C, Raw carrot; P-C, Pealed carrot; R-P, Raw green peas; P-P, Prepared green peas; W, Blanching water; W-P, Blanched green peas in-flow; W-POF, Blanched green peas out-of-flow; W-S, Blancher surface; T-POF, Green peas debris on conveyor; T-S, Conveyor belt surface; T-P/C, Green peas, alone or mixed with carrots, transferred to can filling machine; B, Brine; B-S, Brine tank surface; B-P/C, Green peas, alone or mixed with carrots, in cans with covering brine

<sup>b</sup> Averages are expressed as log<sub>10</sub> cfu/g for solid sample, log<sub>10</sub> cfu/mL for liquid sample and log<sub>10</sub> cfu/cm<sup>2</sup> for surface sample. Different letters between samples of the same year correspond to significant differences (P<0.05)

<sup>c</sup> NS (S) non significant (significant) difference between 2011 and 2012 samples at P < 0.05.



**Figure 2: Distribution of thermophilic anaerobic spore levels according to process sampling**

Distribution is represented by Box-and-Whisker plots for thermophilic anaerobic spore counts (A) and highly heat resistant thermophilic anaerobic spore counts (B). The samples were SL, Soil of the green peas plot; R-C, Raw carrot; P-C, Peeled carrot; R-P, Raw green peas; P-P, Prepared green peas; W, Blanching water; W-P, Blanched green peas in-flow; T-P/C, Green peas, alone or mixed with carrots, transferred to can filling machine; B, Brine; B-P/C, Green peas, alone or mixed with carrots, in cans with covering brine; W-POF, Blanched green peas out-of-flow; T-POF, Green peas debris on conveyor; W-S, Blancher surface; T-S, Conveyor belt surface and B-S, Brine tank surface (See Table 1). Enumeration is expressed as  $\log_{10}$  cfu/g, /ml or /cm<sup>2</sup>. In the “Box-and-Whisker” representation, the central “box” covers the middle 50% of the data values between the lower and the upper quartiles. The central line in the “box” shows the median. Whiskers extend 1.5 times the box length (interquartile range). External values are plotted. Plain diamonds (◆) correspond to 2011 sample, empty diamonds (◇) to 2012 samples.

Spore counts levels of in-flow vegetables decreased during the process until pea blanching (W-P samples) and carrot peeling (P-C samples) and did not significantly changed afterwards until final product (T-P/C and BC). TAS and HHR TAS counts from washed and peeled carrots (P-C) were  $0.4 \pm 0.0$  log cfu/g and  $0.5 \pm 0.0$  log cfu/g, respectively. TAS and HHR TAS counts from prepared peas (P-P) were  $1.3 \pm 0.6$  log cfu/g and  $0.6 \pm 0.1$  log cfu/g respectively, and the latter significantly differed ( $P < 0.05$ ) from raw pea counts. From pea blanching step (W-P) to vegetables in cans covered with brine (B-P/C), mean populations remained relatively constant. Furthermore, TAS count in blanched in-flow peas (W-P), peas, alone or mixed with carrots, just filled in can (T-P/C), blanching water (W) and brine (B) were the lowest average values and ranged between  $0.3 \pm 0.7$  log cfu/g to  $0.6 \pm 0.4$  log cfu/g. Similar results were observed for HHR TAS as spore count levels were comprised in the same range for these B-P/C, W-P, T-P/C, W and B samples. Interestingly, extremes values increased considerably between blancher and brine filling step (**Figure 2**). Variation coefficients on spore counts in blanching water, covering brine and canned product before thermal treatment (B-P/C) varied between 20 and 210%.

The population of TAS and HHR TAS determined in out of the flow lateral debris (W-POF and T-POF) ranged from  $1.2 \pm 0.4$  log cfu/g to  $2.4 \pm 0.9$  log cfu/g for TAS and from  $0.9 \pm 0.2$  log cfu/g to  $2.0 \pm 0.9$  log cfu/g for HHR TAS. The number of TAS collected on equipment surfaces (W-S, T-S and B-S) at the end of the production day ranged from  $<1$  log cfu/cm<sup>2</sup> to  $1.1 \pm 1.2$  log cfu/cm<sup>2</sup>. It varied from  $<1$  log cfu/cm<sup>2</sup> to  $1.4 \pm 0.9$  log cfu/cm<sup>2</sup> for HHR TAS. Surface spore counts presented high variation depending on the sample and variation coefficients were above 60%.

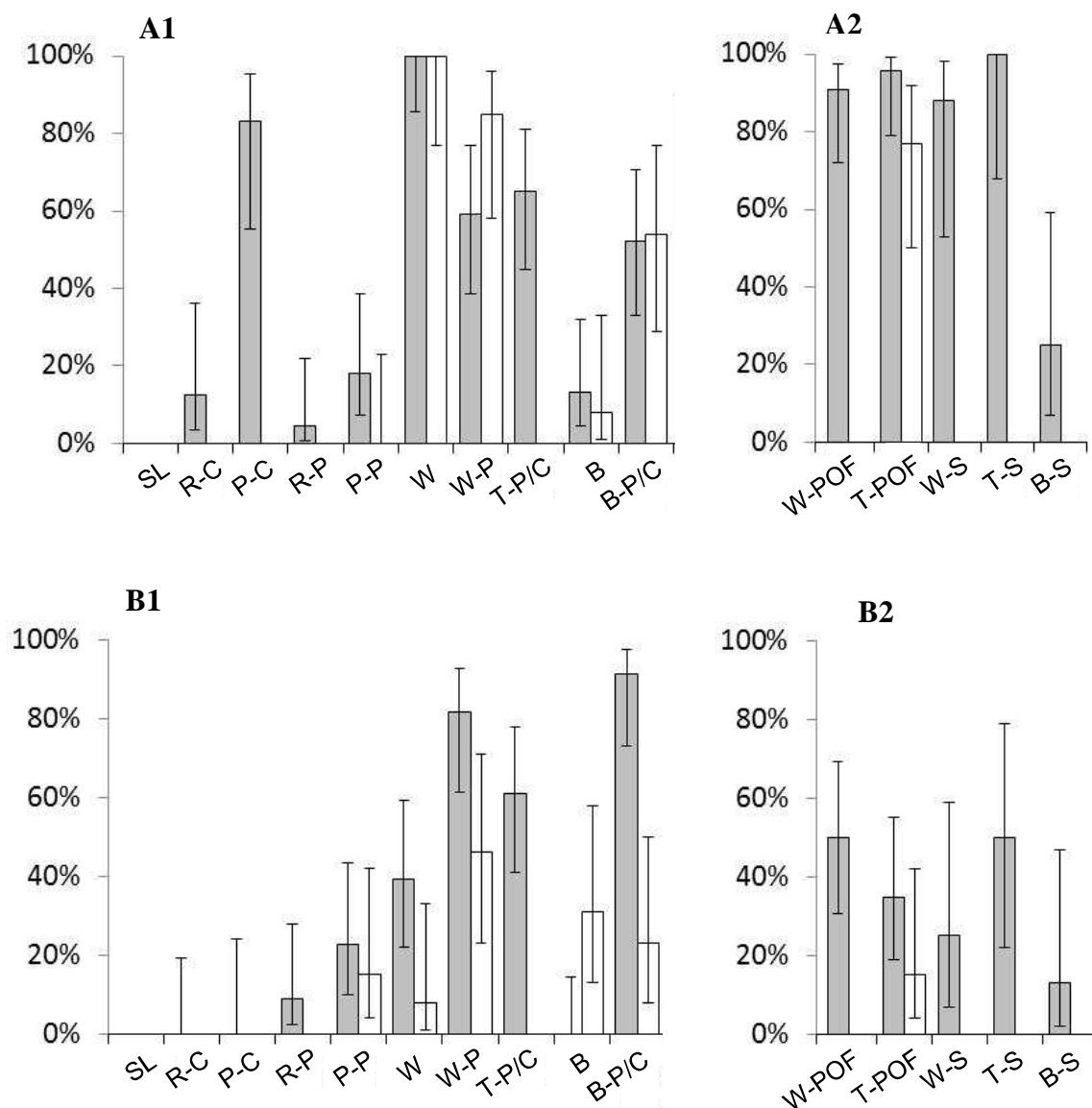
#### *2.4.2 Temperature measurement along the processing chain*

Temperatures measured in 2011 along the processing chain (**Table 1**) ranged between, 17.9-25.4°C (ambient temperature) and  $85.7 \pm 1.1$ °C (blanching water). After blanching, in-flow pea temperature was still high at  $83.9 \pm 4.7$ °C. Temperatures of samples T-P/C, B-P/C and brine (B) were comprised between  $43.1 \pm 6.6$  and  $69.3 \pm 7.3$ °C. Temperatures of lateral debris W-POF and T-POF were at  $46.6 \pm 5.3$ °C and  $41.8 \pm 9.2$ °C respectively. Standard deviation of all sample temperatures notably increased after the blanching step.

### 2.4.3 Prevalence of *M. thermoacetica/thermoautotrophica*, *Thermoanaerobacterium* spp. and *G. stearothermophilus*

A total of 333 2011 and 2012 samples were examined after anaerobic enrichment for the presence of the thermophilic species, *M. thermoacetica/thermoautotrophica*, *Thermoanaerobacterium* spp. and *G. stearothermophilus* (**Figure 3**). Depending on the nature of the samples, *G. stearothermophilus* prevalence ranged between 0% and 100%, and *M. thermoacetica/thermoautotrophica* prevalence between 0% and 91%. Conversely, *Thermoanaerobacterium* spp was never detected in samples except in 17% of blanching water 2011 samples and was therefore considered as a minor microbiological contaminant in the processing plant at time of survey. With a 0.95 confidence interval, *G. stearothermophilus* prevalence in raw vegetables was 5% [1;22] for peas and 13% [3;36] in carrots. *M. thermoacetica/thermoautotrophica* prevalence was 9% [3;28] and 0% [0;1] respectively in raw peas and raw carrots. The prevalence of these two bacteria increased progressively in the flow during process. *G. stearothermophilus* was detected in 18% [7;39], 59% [39;77] and 65% [45-81] of prepared peas (P-P), blanched in flow peas (W-P) and peas, alone or mixed with carrots, just filled in can (T-P/C) respectively. For the same samples, *M. thermoacetica/thermoautotrophica* was detected respectively in 23% [10;43], 82% [61;93] and 61% [41;78] of them. A maximal *M. thermoacetica/thermoautotrophica* prevalence of 91% [73;98] was observed in peas, alone or mixed with carrots, plus brine in can (B-P/C). Covering brine (B) samples exhibited a low prevalence for both bacteria. Interestingly, the highest prevalence at 100 % [86;100] was observed for *G. stearothermophilus* in blanching water (W). Significant differences (no overlap in 95 % confidence intervals) were observed for *G. stearothermophilus*: between raw and blanched peas, and between prepared peas and blancher water (Suppl **Table S1**). For *M. thermoacetica/thermoautotrophica*, significant differences were noticed between raw peas and blanched peas, between prepared peas and blanched peas, and between raw peas and raw carrots and peas, alone or mixed with carrots in can with brine.

Surfaces from blancher (W-S) and transfer conveyor (T-S) but also samples from out flow peas (W-POF and T-POF) exhibited high prevalence values for *G. stearothermophilus* spores, up to 100%. *M. thermoacetica/thermoautotrophica* prevalence did not significantly differ between surface, debris and in-flow samples. The brine tank surface (B-S) was the least contaminated with 25% [7;59] or 13% [2;47] prevalence for each bacterium, respectively *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica/thermoautotrophica*.



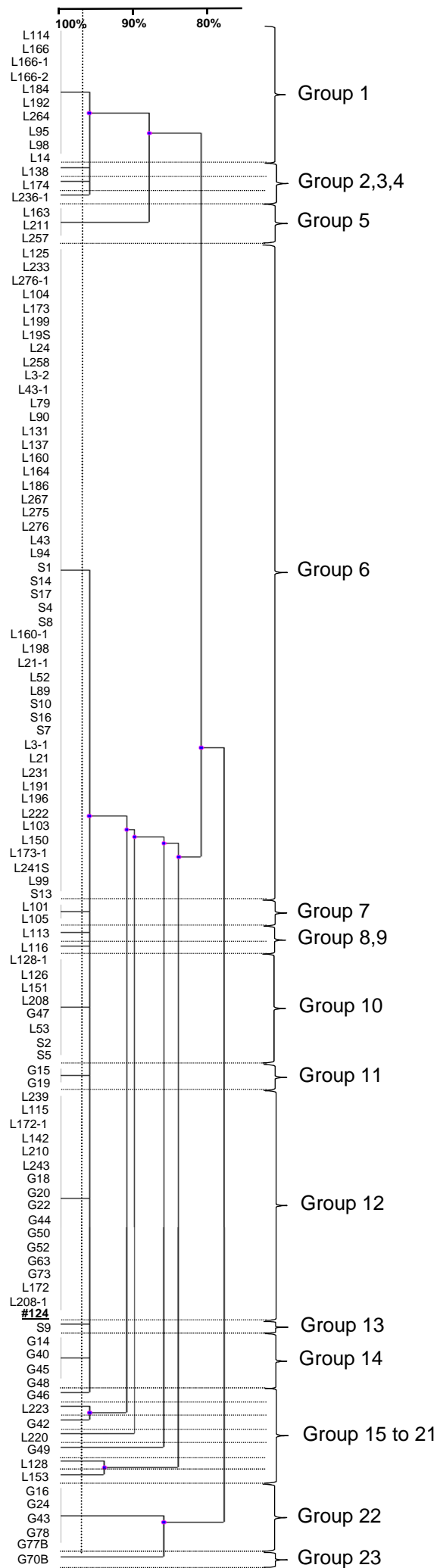
**Figure 3: Prevalence of *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* on the process line**

A: *Geobacillus stearothermophilus* prevalence in samples (% positives) collected in flow (A1) or out flow and from surfaces (A2); B: *Moorella thermoacetica* incidence in samples (% positives) collected in flow (B1) or out flow and from surfaces (B2). The samples were SL, Soil; R-C, Raw carrot; P-C, Peeled carrot; R-P, Raw green peas; P-P, Prepared green peas; W, Blanching water; W-P, Blanched green peas in-flow; T-P/C, Green peas, alone or mixed with carrots, transferred to can filling machine; B, Brine; B-P/C, Green peas, alone or mixed with carrots, in cans with covering brine; W-POF, Blanched green peas out-of-flow; T-POF, Green peas debris on conveyor; W-S, Blancher surface; T-S, Conveyor belt surface and B-S, Brine tank surface. Gray (white) bars correspond to 2011 (2012) samples. Error bars cover the 95% confidence interval of calculated proportion.

In 2012, for *G. stearothermophilus*, the prevalence observed did not significantly differ from 2011 values. The same observation was made for *M. thermoacetica*, except that B-P/C prevalence was significantly lower in 2012.

#### 2.4.4 Analysis of the diversity among *G. stearothermophilus* isolates with M13-PCR

A total 112 (87 in 2011 and 25 in 2012) *G. stearothermophilus* isolates were recovered. All those isolates were genotyped by M13-PCR method. Electrophoresis patterns were obtained for all isolates. Detected DNA bands varied from 10 to 17 with sizes of 200 to 4000 bp. A similarity threshold at 97% resulted in 23 profile-types (**Figure 4** and Suppl Fig 1). Visual observation of M13-PCR patterns indicated that these profile-types were overall reliable. From these 23 profile types, nine corresponded to groups of isolates with identical profiles and 14 corresponded each to a single isolate (**Table 3**). Group 6 was the largest group and gathered 43% of all isolates. Three groups, 12, 1 and 10, gathered eight to 16 isolates each. The other groups, numbered 22, 14, 5, 7 and 11, represented only two to five isolates each. All isolates that belong to groups 6, 1, 5 and 7 were recovered from 2011 samples. Groups 11, 14 and 22 were formed by isolates obtained only in 2012 but group 12 was composed of 50% isolates recovered in 2011 and 50% in 2012. Isolates that belonged to group 6 originated from all different samples except from T-P/C, B-S and B-P/C. This group represented up to 85% of isolates from blanched pea out of flow (W-POF), pea debris on conveyor (T-POF), conveyor surface (T-S) and brine (B). Group 12 isolates were essentially isolated from blanching water and blanched peas, but were also isolated from transfer debris (T-POF), brine, and peas, alone or mixed with carrots, in can, with or without brine (T-P/C and B-P/C). Group 1 and to a lesser extent group 22 isolates were equally isolated from processed peas in cans, either with brine or not (T-P/C and B-P/C) and from blanching water and blanched peas (W and W-P). It is noteworthy that marker-bands were specific of a given group. These marker-bands were characterized by a higher intensity in the fingerprint and/or a specific size. Electrophoretic profiles from types 1 to 4, that share 92% similarity, had three common marker-bands at approximately 510, 470 and 420 pb. Strains from groups 10, 12, 14 or 22 had marker-bands approximately at 3000 bp, 2000bp, 730bp or 470bp respectively. Moreover, a marker-band at 730 bp, characteristic of group 12, was detected by M13-PCR fingerprint on several *G. stearothermophilus* strains involved in spoilage of canned vegetables, and one of those strains, #124 (Durand et al., 2014), was isolated from spoiled canned green peas from the same French cannery (**Figure 4**).



**Figure 4: Dendrogram of *G. stearothermophilus* isolate profile-types obtained with the M13-PCR method**

The percentage similarity represented by the horizontal scale was calculated using Dice's coefficient and clustering was performed by UPGMA. Profile-types obtained at 97% of similarity threshold are separated with the vertical scale and labelled with numbers.

**Table 3: Distribution of *G. stearotherophilus* isolates according to sampling origin and genetic M13-PCR profile-types**

| Sample origin <sup>a</sup> | Number of isolates | Number of isolates by profile-type |                 |    |                 |    |    |   |   |    | Ungrouped profile-types |
|----------------------------|--------------------|------------------------------------|-----------------|----|-----------------|----|----|---|---|----|-------------------------|
|                            |                    | 6                                  | 12 <sup>b</sup> | 1  | 10 <sup>b</sup> | 22 | 14 | 5 | 7 | 11 |                         |
| Total 2011                 | 87                 | 48                                 | 8               | 10 | 7               |    |    | 3 | 2 |    | 9                       |
| Total 2012                 | 25                 |                                    | 8               |    | 1               | 5  | 4  |   |   | 2  | 5                       |
| Total                      | 112                | 48                                 | 16              | 10 | 8               | 5  | 4  | 3 | 2 | 2  | 14                      |
| R-P                        | 1                  | 1                                  |                 |    |                 |    |    |   |   |    |                         |
| W                          | 27                 | 8                                  | 4 (1)           | 3  | 2 (1)           | 1  | 3  | 1 |   |    | 5                       |
| W-P                        | 23                 | 7                                  | 7 (4)           | 2  | 1 (1)           | 2  | 1  |   |   | 2  | 1                       |
| W-POF                      | 7                  | 6                                  |                 |    |                 |    |    |   |   |    | 1                       |
| W-S                        | 6                  | 6                                  |                 |    |                 |    |    |   |   |    |                         |
| P-C                        | 2                  | 2                                  |                 |    |                 |    |    |   |   |    |                         |
| T-POF                      | 17                 | 11                                 | 1 (1)           |    | 2 (2)           |    |    | 2 |   |    | 1                       |
| T-S                        | 5                  | 3                                  |                 |    | 2 (2)           |    |    |   |   |    |                         |
| T-P/C                      | 10                 |                                    | 2 (2)           | 3  | 1 (1)           |    |    |   | 1 |    | 3                       |
| B                          | 5                  | 4                                  | 1 (0)           |    |                 |    |    |   |   |    |                         |
| B-S                        | 1                  |                                    |                 |    |                 |    |    |   |   |    | 1                       |
| B-P/C                      | 8                  |                                    | 1 (0)           | 2  |                 | 2  |    |   | 1 |    | 2                       |

<sup>a</sup> The samples were collected at different stages of the processing line : R-P, Raw green peas; W, Blanching water; W-P, Blanched green peas in-flow; W-POF, Blanched green peas out-of-flow; W-S, Blancher surface; P-C, Peeled carrot; T-POF Green peas debris on conveyor; T-S, Conveyor belt surface; T-P/C, Green peas, alone or mixed with carrots, transferred to can filling machine; B, Brine; B-S, Brine tank surface and B-P/C, Green peas, alone or mixed with carrots, in cans with covering brine.

<sup>b</sup> in parentheses, number of isolates collected in 2011.



## 2.5 Discussion

Microbiological non-stability of canned food due to thermophilic bacteria represents significant economic costs for industrial canning. The survival of thermophilic spores to thermal treatment is the main cause of canned food spoilage. A better knowledge of levels of spore contamination and prevalence of the main spore-forming species that cause spoilage on the processing line is necessary to rationalize heat treatment and hygiene procedures. In this study, we examined several zones on the production line from the raw vegetables to the canned product before heat treatment. The prevalence of the three thermophilic bacteria the most frequently implied in canned food spoilage (André et al., 2013) was determined after sample enrichment using a sensitive previously developed method (Prevost et al., 2010). *Thermoanaerobacterium* spp. was rarely detected in the present work, which confirms a low prevalence reported in a range of spoiled canned vegetables (André et al., 2013). The average spore population in soil was at  $10^3$  cfu/g. The highest spore population was found in raw carrots and the average population in those samples was close to those reported by Sevenier et al. (2012) in the same product (mean  $\pm$  SD,  $2.6 \pm 0.1$  log cfu/g, but with a much higher dispersion of values in the present work). Soil can be therefore considered as a highly probable major source of spore contamination in the studied industrial plant. A direct contact with soil could explain higher spore population on carrots than on peas growing in aerial part of plants. *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetic/thermoautotrophica* were similarly present at low prevalence levels in raw vegetables, as previously observed (Sevenier et al., 2012). Raw materials were thus the main way for HHR spore entrance in the processing line. Similar interpretations have been done on zucchini contamination pathways by *B.cereus* (Guinebretiere et al., 2003).

Spore counts decrease along processing, especially between raw vegetables and prepared vegetables, evidenced in this work could be explained by multiple washing steps, as previously described (Sevenier et al., 2012). Raw vegetables were prepared at room temperature (8°C to 25°C) which likely impairs the multiplication and sporulation of thermophilic bacteria (Scott et al., 2007).

As a consequence of vegetable preparation, spore populations at the entrance of the process zone at elevated temperature were low (0.4 to 1.3 log cfu/g). The range of temperatures supporting growth of thermophilic spore-formers, including *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* (Fontaine et al., 1942; Coorevits et al., 2012), suggests that multiplication of thermophiles and eventually spore formation may occur only in a few niches along the processing line. These niches are out-of-flow peas (B-POF and T-

POF), brine and peas in cans, alone or mixed with carrots, with or without brine (T-P/C and B-P/C), and probably surfaces, because of temperatures comprised between 41°C and 69°C. The residence time of in-flow vegetables seems to be short enough to prevent significant growth or sporulation, as in-flow vegetables TAS and HHR TAS populations remained unchanged after blanching. On the other hand, high residence time (i.e. > several hours) of contaminated food is a common feature on equipment surfaces, in processing liquid samples and in out-of-flow samples. For instance excess covering brine was recycled all along the production day and accumulated vegetable debris on the lateral side of the chain were eliminated only at the end of the production day at time of cleaning. Nutrients are available, in the processed food itself or in recycled brine because of the diffusion of food constituents. Consequently growth and eventually sporulation may locally occur. Spores accumulated on surfaces and in vegetable debris may be randomly released in the course of production leading to high variations in spore counts in the product before thermal treatment. This is confirmed by *G. stearothermophilus* genotypic analysis showing the presence of isolates from groups 10 and 12 at different accumulation locations (T-POF, T-S, B), then in vegetables in cans (T-P/C and B-P/C).

Genetic groups 6, 1, 5 and 7 were specifically detected in 2011, whereas groups 22, 14 and 11 were 2012-specific. Meanwhile, group 12 isolates were found in both 2011 and 2012 and group 10, essentially detected in 2011 had also one representative among the 2012 isolates. This temporal distribution indicates annual variations in the most frequent strains from vegetables despite the same location of crops and the same geographical processing environment. There did not seem to have a year-specific ecology on the processing line as isolates were recovered independently of year from different cannery samples.

A remarkable observation was the large prevalence increase at blanching step. Blanching temperature is not compatible with spore formation neither vegetative cells growth. This process step aims to inactivate enzymes and vegetative cells and fixes pea color. Blanching inactivates many spores enumerated among TAS, but much less in those counted among HHR TAS. The heat treatment applied in the blanching water may select HHR spore-formers such as *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica*. The blancher in the surveyed processing chain worked with continuous water recycling and steam production during vegetable processing. A likely hypothesis to explain the prevalence increase is that HHR spores entered the blanching machine with prepared peas, were partly released in water from vegetables and then cross-contaminated peas that later went through the blanching tank. Interestingly, all *G. stearothermophilus* genetic groups determined in this study included isolates that came

from blanching water. Isolates from blanching water and blanched peas were distributed in the same genetic groups and with similar proportions. The isolates found in the canned product, with or without brine (T-P/C and B-P/C), belonged to five groups, numbered 12, 1, 10, 22 and 7, plus five ungrouped profile-types. One of these ungrouped profile-types clustered with group 1 at the 92% level and exhibited the same marker bands. Four out of these five groups include also isolates that were detected at the blancher step, both in water and blanched peas, and in a lesser part isolates from transfer debris, transfer surface or brine. This clearly showed that blanching step contributed to the dissemination of strains to the product before heat treatment.

Group 6 isolates were distributed homogeneously in the processing chain between debris, surface, brine and blancher water, but were in higher proportion compared to in-flow blanched peas. Absence of group 6 isolates in final product supports the assumption that final product contamination mostly reflects in-flow peas and carrots contamination, rather than accumulation and release events. In this study, marker bands were specifically detected for groups 1, 10, 12, 14 and 22. As indicated, a *G. stearothermophilus* strain isolated in 2010 in spoiled canned green peas from the same cannery presented the same marker-band. These bands are particularly of interest for groups identified in the foods before heat treatment. The sequence of these bands could be used for specific detection before heat treatment of isolates implied in canned food spoilage.

### **Acknowledgments**

This work forms part of author Loïc Durand's PhD thesis. He received a grant from the *Association Nationale de la Recherche et de la Technologie*, Paris, France. The research work was supported by France AgriMer and by the Conseil Regional Provence-Alpes-Côte d'Azur (DIVERSITHER project). This research work is also a contribution to the activities of the *Unité Mixte Technologique Qualiveg*.

**Suppl. Table S1**

Statistical test on *G. stearothermophilus* prevalence between different samples collected in 2011

| Proportions               | Absolute difference | Critical level | Significance |
|---------------------------|---------------------|----------------|--------------|
| $ p(R-P) - p(P-P) $       | 0.136               | 0.415          | no           |
| $ p(R-P) - p(W-P) $       | 0.545               | 0.505          | yes          |
| $ p(R-C) - p(P-C) $       | 0.708               | 0.602          | yes          |
| $ p(P-P) - p(W-P) $       | 0.409               | 0.591          | no           |
| $ p(P-P) - p(W) $         | 0.818               | 0.365          | yes          |
| $ p(W-P) - p(W) $         | 0.409               | 0.465          | no           |
| $ p(W-P) - p(W-POF) $     | 0.318               | 0.539          | no           |
| $ p(W-P) - p(T-POF) $     | 0.366               | 0.502          | no           |
| $ p(W-P) - p(T-P/C) $     | 0.061               | 0.641          | no           |
| $ p(W-P) - p(B-P/C) $     | 0.069               | 0.655          | no           |
| $ p(W) - p(W-POF) $       | 0.091               | 0.272          | no           |
| $ p(W-POF) - p(T-POF) $   | 0.047               | 0.331          | no           |
| $ p(W-POF) - p(T-P/C) $   | 0.257               | 0.518          | no           |
| $ p(W-POF) - p(B-P/C) $   | 0.387               | 0.536          | no           |
| $ p(T-POF) - p(T-P/C) $   | 0.304               | 0.479          | no           |
| $ p(T-POF) - p(B-P/C) $   | 0.435               | 0.499          | no           |
| $ p(P-C) - p(T-P/C) $     | 0.181               | 0.649          | no           |
| $ p(P-C) - p(B-P/C) $     | 0.312               | 0.664          | no           |
| $ p(T-P/C) - p(B) $       | 0.522               | 0.540          | no           |
| $ p(T-P/C) - p(B-P/C) $   | 0.130               | 0.638          | no           |
| $ p(B) - p(B-P/C) $       | 0.391               | 0.557          | no           |
| $ p(B-P/C) - p(W.T.B-S) $ | 0.187               | 0.619          | no           |

Statistical test on *G. stearothermophilus* prevalence between different samples collected in 2012

| Proportions             | Absolute difference | Critical level | Significance |
|-------------------------|---------------------|----------------|--------------|
| $ p(P-P) - p(W-P) $     | 0.769               | 0.389          | yes          |
| $ p(P-P) - p(W) $       | 1.000               | 0.000          | yes          |
| $ p(W-P) - p(W) $       | 0.231               | 0.389          | no           |
| $ p(W-P) - p(B-P/C) $   | 0.385               | 0.594          | no           |
| $ p(B) - p(B-P/C) $     | 0.308               | 0.512          | no           |
| $ p(B-P/C) - p(T-POF) $ | 0.077               | 0.619          | no           |

Statistical test on *G. stearotherophilus* prevalence between samples that differ by year of collection

| Proportions                   | Absolute difference | Critical level | Significance |
|-------------------------------|---------------------|----------------|--------------|
| p(2011 P-P) - p(2012 P-P)     | 0.182               | 0.365          | no           |
| p(2011 W-P) - p(2012 W-P)     | 0.178               | 0.696          | no           |
| p(2011 W) - p(2012 W)         | 0.000               | 0.000          | no           |
| p(2011 T-POF) - p(2012 T-POF) | 0.649               | 0.598          | yes          |
| p(2011 B) - p(2012 B)         | 0.054               | 0.452          | no           |
| p(2011 B-P/C) - p(2012 B-P/C) | 0.137               | 0.756          | no           |

Statistical test on *M. thermoacetica/thermoautotrophica* prevalence between different samples collected in 2011

| Proportions           | Absolute difference | Critical level | Significance |
|-----------------------|---------------------|----------------|--------------|
| p(R-P) - p(P-P)       | 0.136               | 0.481          | no           |
| p(R-P) - p(W-P)       | 0.727               | 0.455          | yes          |
| p(R-C) - p(P-C)       | 0.000               | 0.000          | no           |
| p(P-P) - p(W-P)       | 0.591               | 0.539          | yes          |
| p(P-P) - p(W)         | 0.164               | 0.601          | no           |
| p(W-P) - p(W)         | 0.427               | 0.580          | no           |
| p(W-P) - p(W-POF)     | 0.318               | 0.597          | no           |
| p(W-P) - p(T-P/C)     | 0.209               | 0.580          | no           |
| p(W-P) - p(B-P/C)     | 0.095               | 0.448          | no           |
| p(W) - p(W-POF)       | 0.109               | 0.654          | no           |
| p(W-POF) - p(T-POF)   | 0.152               | 0.646          | no           |
| p(W-POF) - p(T-P/C)   | 0.109               | 0.654          | no           |
| p(W-POF) - p(B-P/C)   | 0.413               | 0.540          | no           |
| p(T-POF) - p(T-P/C)   | 0.261               | 0.631          | no           |
| p(T-POF) - p(B-P/C)   | 0.565               | 0.512          | yes          |
| p(P-C) - p(T-P/C)     | 0.609               | 0.451          | yes          |
| p(P-C) - p(B-P/C)     | 0.913               | 0.261          | yes          |
| p(T-P/C) - p(B)       | 0.609               | 0.451          | yes          |
| p(T-P/C) - p(B-P/C)   | 0.304               | 0.521          | no           |
| p(B) - p(B-P/C)       | 0.913               | 0.261          | yes          |
| p(B-P/C) - p(W.T.B-S) | 0.580               | 0.500          | yes          |

Statistical test on *M. thermoacetica/thermoautotrophica* prevalence between different samples collected in 2012

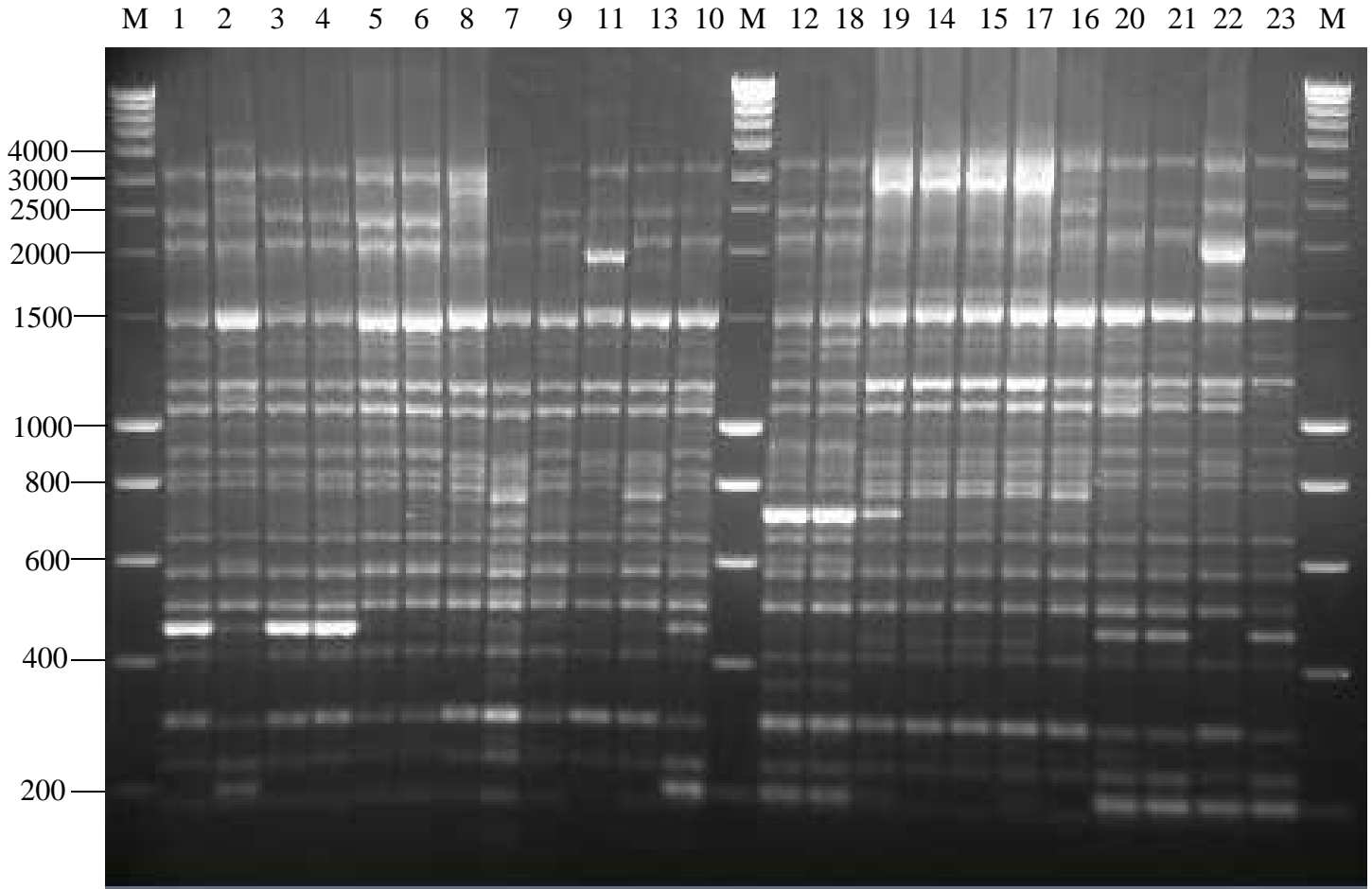
| Proportions         | Absolute difference | Critical level | Significance |
|---------------------|---------------------|----------------|--------------|
| p(P-P) - p(W-P)     | 0.308               | 0.568          | no           |
| p(P-P) - p(W)       | 0.077               | 0.414          | no           |
| p(W-P) - p(W)       | 0.385               | 0.522          | no           |
| p(W-P) - p(B-P/C)   | 0.231               | 0.602          | no           |
| p(B) - p(B-P/C)     | 0.077               | 0.577          | no           |
| p(B-P/C) - p(T-POF) | 0.077               | 0.512          | no           |

Statistical test on *M. thermoacetica/thermoautotrophica* prevalence between samples that differ by year of collection

| Proportions                   | Absolute difference | Critical level | Significance |
|-------------------------------|---------------------|----------------|--------------|
| p(2011 P-P) - p(2012 P-P)     | 0.073               | 0.595          | no           |
| p(2011 W-P) - p(2012 W-P)     | 0.357               | 0.714          | no           |
| p(2011 W) - p(2012 W)         | 0.314               | 0.558          | no           |
| p(2011 T-POF) - p(2012 T-POF) | 0.194               | 0.625          | no           |
| p(2011 B) - p(2012 B)         | 0.308               | 0.568          | no           |
| p(2011 B-P/C) - p(2012 B-P/C) | 0.682               | 0.580          | yes          |

Statistical test on prevalence by sampling stage between *M. thermoacetica/thermoautotrophica* (*Moo*) and *G. stearothermophilus* (*Gbs*)

| Proportions                 | Absolute difference | Critical level | Significance |
|-----------------------------|---------------------|----------------|--------------|
| p(Gbs-R-P) - p(Moo-R-P)     | 0.045               | 0.479          | no           |
| p(Gbs-R-C) - p(Moo-R-C)     | 0.125               | 0.524          | no           |
| p(Gbs-P-P) - p(Moo-P-P)     | 0.045               | 0.769          | no           |
| p(Gbs-W-P) - p(Moo-W-P)     | 0.227               | 0.844          | no           |
| p(Gbs-W) - p(Moo-W)         | 0.609               | 0.645          | no           |
| p(Gbs-W-POF) - p(Moo-W-POF) | 0.409               | 0.779          | no           |
| p(Gbs-T-POF) - p(Moo-T-POF) | 0.609               | 0.684          | no           |
| p(Gbs-P-C) - p(Moo-P-C)     | 0.833               | 0.681          | yes          |
| p(Gbs-T-P/C) - p(Moo-T-P/C) | 0.043               | 0.901          | no           |
| p(Gbs-B) - p(Moo-B)         | 0.130               | 0.445          | no           |
| p(Gbs-B-P/C) - p(Moo-B-P/C) | 0.391               | 0.757          | no           |
| p(Gbs-W-S) - p(Moo-W-S)     | 0.625               | 1.220          | no           |
| p(Gbs-T-S) - p(Moo-T-S)     | 0.375               | 1.084          | no           |
| p(Gbs-B-S) - p(Moo-B-S)     | 0.125               | 1.220          | no           |



**Suppl. Figure 1: Example of M13-PCR banding pattern of 23 *G. stearothermophilus* strains isolated on line product**

Lanes 1-6: L114, L138, L174, L236-1, L257, L125. Lanes 8, 7, 9, 12, 13, 10: L113, L105, L116, G19, S9, S2. Lanes 12, 18, 19, 14, 15, 17, 16: L210, L220, G49, G40, G46, G42, L223. Lanes 20-23: L128, L153, G16, G70b. Lane M: DNA molecular size marker Smart Ladder (Eurogentec). The number of lines corresponds to the M13-PCR profile-types.

## Chapitre 6

### Discussion générale

Ces travaux de doctorat visaient deux objectifs. D'une part, améliorer les connaissances sur deux bactéries anaérobies thermophiles, *G. stearothermophilus* et *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica*. Ces deux espèces ont été choisies en raison de leur fréquence élevée dans les cas d'altération des conserves alimentaires à 55°C. D'autre part, décrire l'écologie d'une ligne de transformation de légumes en conserve afin de comprendre les flux de contamination en spores et d'identifier les pratiques conduisant à un manque de maîtrise de la stabilité des conserves.

Les deux espèces bactériennes au cœur de cette étude présentent la particularité de former des spores hautement thermorésistantes. La présence de ces spores avant traitement thermique a conduit les industriels de la conserve à augmenter progressivement, au cours des cinquante dernières années, les barèmes de traitement thermique, aux dépens des qualités sensorielles des produits. La position taxonomique de ces espèces a été établie en 2001 (Nazina *et al.*, 2001) pour *G. stearothermophilus* et en 1994 (Collins *et al.*, 1994) pour *M. thermoacetica/thermoautotrophica*. Les descriptions les plus récentes datent de 2012 (Coorevits *et al.*, 2012) et 2011 (Bergey's 2<sup>nd</sup> Ed vol 3) et sont basées sur un nombre restreint de souches. Afin d'aborder la diversité au sein de ces deux espèces, le choix a été fait d'utiliser en premier crible une approche basée sur la diversité génétique entre les isolats disponibles en collection. Une méthode commune de typage moléculaire a été sélectionnée parmi un large choix décrit dans la bibliographie. Le choix d'une méthode de typage dépend des objectifs que l'on se fixe : le pouvoir discriminant, la rapidité d'obtention de l'information et les ressources financières et techniques qui sont mises à disposition. La M13-PCR est une technique à faible coût, plus reproductible que la RAPD et dont l'intérêt a été prouvé pour le typage de *B. cereus*. Dans notre étude, elle a permis de fournir rapidement des résultats avec un haut pouvoir de discrimination et a été appliquée pour un grand nombre d'isolats, plus de 239 pour *G. stearothermophilus* et 85 pour *M. thermoacetica*.

Les résultats obtenus pour *G. stearothermophilus* ont montré une faible diversité parmi les souches isolées de cas de non stabilité de conserves. Ces résultats ont été confirmés par le



séquençage du gène *panC* qui a montré une similarité de séquence entre les 20 souches testées supérieure à 98,5%. La méthode de REP-PCR appliquée sur 24 isolats a aussi confirmé la faible diversité. Les groupes formés avec cette méthode réunissaient des souches qui n'avaient pas d'origine géographique commune, ne provenaient pas de matrice alimentaire similaire et n'étaient pas isolées de la même d'année. Deux hypothèses expliquent la faible diversité génétique observée. La majorité des isolats testés dans cette étude proviennent de spores qui ont résisté au traitement d'appertisation. La sélection se produisant alors conduirait à restreindre la diversité. L'autre hypothèse serait que cette espèce présente une structure très monomorphique. Cette hypothèse est en accord avec la bibliographie sur la diversité génétique dans le genre *Geobacillus*, qui montre une forte conservation des gènes de ménage et des régions codant l'ARNr 16S. Toutefois, malgré la faible diversité observée, des bandes marqueurs de certains groupes génétiques ont été repérées. Les résultats de typage ont montré que des souches isolées du produit avant appertisation avaient un profil de bandes similaires à un isolat provenant d'un cas d'altération de la même usine et également provenant d'usines différentes. L'analyse plus poussée de ce profil a révélé la présence d'une bande-marqueur spécifique. L'utilisation de la séquence de cette bande pour développer un outil spécifique de traçage de ces groupes génétiques entre dans les perspectives appliquées de ces travaux. Cette méthode de recherche rapide pourrait être une alternative plus rapide aux méthodes classiques qui nécessitent d'attendre le développement de la bactérie pour pouvoir confirmer un problème d'hygiène sur la ligne de production.

Contrairement à *G. stearothermophilus*, la diversité génétique au sein de l'espèce *M. thermoacetica/thermoautotrophica* est bien plus élevée. Cette conclusion a été établie avec la méthode de M13-PCR, et renforcée par l'application de la méthode MLVA. Cette dernière méthode a été spécialement mise au point dans le cadre de ces travaux. Nous avons montré que l'utilisation de deux couples d'amorces amplifiant des VNTR indépendants était suffisante pour obtenir le même niveau de discrimination que la M13-PCR. La MLVA présente pour des applications futures un fort potentiel. En effet, l'un de ses intérêts est de pouvoir être appliquée sans nécessité d'isoler préalablement les souches. Cette caractéristique, qui doit toutefois faire l'objet de vérifications pour sa spécificité, est particulièrement intéressante pour une application à *M. thermoacetica/thermoautotrophica* souvent difficile à isoler de par son temps de génération élevé et ses exigences de croissance en anaérobiose stricte.

Les connaissances sur la diversité génétique au sein des deux espèces étudiées ont été obtenues à l'aide d'une méthode de typage moléculaire et de séquençage de gène pour *G. stearothermophilus* et de deux méthodes de typage moléculaire pour *M. thermoacetica/thermoautotrophica*. Bien que certains auteurs aient montrés des résultats similaires en utilisant d'autres méthodes, l'évolution des méthodes de typage vers le séquençage de génomes entiers va permettre d'apporter des informations supplémentaires plus précises notamment sur le pourcentage d'homologie entre deux souches par exemple. Pour cela, les méthodes de PCR à haut débit déjà utilisées actuellement devraient largement contribuer à cette évolution. Cependant les méthodes de séquençage restent encore coûteuses surtout lorsqu'elles doivent être utilisées sur un nombre important d'échantillons.

S'appuyant sur les groupes génétiques et sur l'origine (aliment, lieu de transformation, année d'isolement) des isolats, deux sous-groupes représentant respectivement 15 et 25% de la collection d'isolats de *G. stearothermophilus* et de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* ont fait l'objet d'une caractérisation phénotypique. Les conditions optimales et extrêmes de croissance (température, pH, plus NaCl uniquement pour *G. stearothermophilus*) sont similaires de celles décrites dans la littérature et dans la caractérisation des espèces. Les conditions de sporulation ont fait l'objet d'une caractérisation et la thermorésistance des spores obtenues en condition optimale a été déterminée. Si la diversité dans les caractéristiques de croissance est limitée entre les isolats de chacune des deux espèces, la résistance thermique des spores est le caractère qui présente le plus de diversité. Un facteur de 6,5 sur la durée nécessaire pour inactiver 5 logs de population est observé entre les isolats de *G. stearothermophilus*. Parmi les souches de *G. stearothermophilus* testées, celles formant les spores les plus résistantes s'avèrent être capable de se développer aux températures minimale et maximale testées, ainsi qu'au plus bas pH et à la plus forte concentration en chlorure de sodium. Parmi ces souches, la souche type DSM22 forme les spores les plus thermorésistantes avec un  $t_{5D}$  de 12,4 min à 120°C. Pour *M. thermoacetica/thermoautotrophica*, la diversité du  $t_{5D}$  à 130°C atteint un facteur 4,0. Le maximum est de 28,5 min pour un isolat issu de conserve non stable de hachis Parmentier. Il est notable de souligner que ce type de plat subit un traitement thermique intense et est composé de flocons de pommes de terre qui subissent eux-mêmes des traitements thermiques lors de leur élaboration, ces éléments pouvant justifier de la sélection des spores les plus thermorésistantes. La valeur de thermorésistance des spores de *G. stearothermophilus* sert de référence pour le calcul des barèmes de traitement thermique à appliquer aux conserves de légumes. Ces données devraient être mise à jour avec les

informations disponibles dans cette étude qui reflètent au plus près la thermorésistance réelle des spores présentes sur les lignes de production. Aussi il serait intéressant de comprendre le comportement de ces spores dans les usines.

La suite des travaux s'est focalisée sur les flux de contamination des spores de bactéries anaérobies thermophiles présentes sur une ligne de transformation de petit pois-carotte. Les résultats montrent une sélection de ces bactéries au cours du procédé. La préparation des légumes à température ambiante permet de diminuer de façon très significative la population en spores apportées par les matières premières. L'étape de blanchiment conduit à une sélection des spores les plus thermorésistantes. Même si les valeurs de dénombrement des spores ne sont pas élevées, la prévalence des espèces thermophiles recherchées dans le blancheur est à son plus haut niveau, jusqu'à 100% d'échantillons positifs pour *G. stearothermophilus*. Les résultats de typage sur les isolats de cette espèce montrent que tous les profils retrouvés le long de la ligne de production ont également été retrouvés dans le blancheur. Cette zone est incontestablement la plus critique de toute l'usine et conduit à la contamination croisée de tous les légumes traversant la machine. Les zones d'accumulation de spores contribuent fortement à la contamination du produit fini par le relargage ponctuel de débris. Les résultats confirment que les spores de bactéries thermophiles identifiées dans ces zones se retrouvent dans le produit fini avant la stérilisation. Nous avons mis en évidence les voies de contamination des spores de bactéries anaérobies thermophiles sur une ligne de production de légume. Cependant, ce n'est pas la seule flore de bactéries formant des spores présente dans les usines et responsable d'altération de conserve. Il est possible de trouver des thermophiles aérobies et des mésophiles aussi bien aérobies qu'anaérobies. Bien que leur fréquence d'altération soit faible, leur présence sur les lignes peut entraîner des phénomènes de compétitions en différents lieux du procédé où les conditions de croissances sont favorables pour tous. Une étude approfondie de cette flore totale apporterait des informations supplémentaires quant aux niches écologiques et aux interactions possibles entre les différentes catégories de bactéries. De plus des souches de *G. stearothermophilus* ont été isolées en tout point de la ligne de fabrication. Cependant aucune d'entre elle n'a été caractérisée phénotypiquement. L'étude de la variabilité physiologique au sein de la flore anaérobie thermophile présente sur les lignes, voir même de la flore totale, apporterait des connaissances générales détaillées sur l'écologie de ligne. Ainsi il serait possible de savoir si une souche isolée sur la ligne présentant la bande-marqueur spécifique a les mêmes caractéristiques physiologiques qu'une souche isolée de produit déjà altéré. Si les résultats

s'avèrent concordants, il sera possible de mettre au point une méthode de détection rapide de *G. stearothermophilus* potentiellement capable d'altérer une conserve alimentaire.

Cette étude nous a donc apportée des informations cruciales sur les zones à risque qu'il serait conseillé de surveiller pour limiter la propagation des spores. Ces résultats sont intéressants pour proposer aux industriels des mesures afin d'améliorer la maîtrise des risques de non-stabilité des conserves à température élevée. Cette maîtrise du risque peut être envisagée à plusieurs niveaux. Tout d'abord, la préparation des légumes pourrait être améliorée de manière à diminuer encore le nombre de spores entrantes au niveau du blancheur. Les travaux menés sur le lavage des légumes à l'aide de sporicides comme l'acide peracétique (APA) sont à ce titre intéressants. L'Anses, Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, vient d'autoriser le lavage des épinards avec de l'APA afin de diminuer la charge microbienne (Avis de l'ANSES, Saisine n°2012-SA-0107). De plus, l'efficacité de l'APA a été confirmée sur les spores de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* (André *et al.*, 2012). D'autre part, la connaissance des températures de croissance des deux espèces, 40°C à 70°C pour *G. stearothermophilus* et 45°C à 68°C pour *M. thermoacetica/thermoautotrophica*, peut être combinée avec le contrôle de la température aux différentes étapes de la transformation du produit. Si appliquer de faibles températures n'est pas envisageable pour des raisons de procédé de fabrication, l'utilisation de températures supérieures au maximum de croissance pourrait être envisagée. Il faut cependant prendre garde par l'application de telles mesures de ne pas sélectionner des spores qui seraient encore plus résistantes. Des innovations au niveau du blancheur, par exemple pour inactiver les spores dans le mélange eau-vapeur dans lequel sont immergés les légumes, pourraient être proposées à la lumière des résultats de notre étude. Enfin, les procédures d'élimination des débris en cours de production pourraient être modifiées.

Le dernier niveau de contrôle pour limiter le risque de non-stabilité est lié aux conditions dans la conserve. Parmi les critères étudiés que sont la température, le pH et la concentration en NaCl permettant la croissance, un abaissement de pH de l'aliment à des valeurs comprises entre 4,5 et 5,0, voire 5,5, limiterait considérablement le risque de développement de *G. stearothermophilus* en diminuant le nombre de souches capables de se développer. En revanche, cette approche n'est pas envisageable pour *M. thermoacetica/thermoautotrophica*. La caractérisation phénotypique des bactéries formant des spores pourraient prendre en compte d'autres caractères physiologiques pour venir compléter cette étude, tels que la

dégradation des sucres, l'utilisation d'acides pour la croissance ou encore la croissance en présence de chlorure de calcium, utilisé comme texturant.

## Références bibliographiques

1. Aarts, H.J.M., van Lith, L., Keijer, J. 1998. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. *Letters in Applied Microbiology* 26, 131-135.
2. ADEPALE. 2011a. Association des Entreprises de Produits Alimentaires Elaborés. La conserve et l'Environnement
3. ADEPALE. 2011b. Association des Entreprises de Produits Alimentaires Elaborés. La conserve et la Nutrition.
4. Adetifa, I.M.O., Antonio, M., Okoromah, C.A.N., Ebruke, C., Inem, V., Nsekong, D., Bojang, A., Adegbola, R.A. 2012. Pre-vaccination nasopharyngeal pneumococcal carriage in a Nigerian population: epidemiology and population biology. *Plos One* 7.
5. Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M., Sahin, F. 2009. Identification and characterization of thermophilic bacteria isolated from hot springs in Turkey. *Journal of Microbiological Methods* 79, 321-328.
6. AFNOR. 1997a. Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés - Méthode de référence, *Microbiologie des aliments*, vol. NF V08-401. Afnor, Paris.
7. AFNOR. 1997b. Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés - Méthode de routine, *Microbiologie des aliments*, vol. NF V 08-408. Afnor, Paris.
8. Alves, A., Santos, O., Henriques, I., Correia, A. 2002. Evaluation of methods for molecular typing and identification of members of the genus *Brevibacterium* and other related species. *Fems Microbiology Letters* 213, 205-211.
9. Anderson, M., Gull, K., Denning, D. 1996. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA and M13 southern hybridization of related paired isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 87-93.
10. André, S., Hédin, S., Remize, F., Zuber, F. 2012. Evaluation of peracetic acid sanitizers efficiency against spores isolated from spoiled cans in suspension and on stainless steel surfaces. *Journal of Food Protection* 75, 371-375.
11. André, S., Zuber, F., Remize, F. 2013. Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *International Journal of Food Microbiology* 165, 134-143.
12. Andreesen, J.R., Schaupp, A., Neurauder, C., Brown, A., Ljungdahl, L.G. 1973. Fermentation of glucose, fructose, and xylose by *Clostridium thermoaceticum*: effect of metals on growth yield, enzymes, and the synthesis of acetate from CO<sub>2</sub>. *Journal of Bacteriology* 114, 743-751.
13. Andrighetto, C., Psomas, E., Tzanetakis, N., Suzzi, G., Lombardi, A. 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products. *Letters in Applied Microbiology* 30, 5-9.

14. Appert, N. 1810. L'art de conserver pendant plusieurs années toutes les substances animales et végétales, Paris.
15. Arias, C., Pujalte, M., Garay, E., Aznar, R. 1998. Genetic relatedness among environmental, clinical, and diseased-eel *Vibrio vulnificus* isolates from different geographic regions by ribotyping and randomly amplified polymorphic DNA PCR. Applied and Environmental Microbiology 64, 3403-3410.
16. Arnold, C., Metherell, L., Clewley, J.P., Stanley, J. 1999. Predictive modelling of fluorescent AFLP: a new approach to the molecular epidemiology of *E. coli*. Research in Microbiology 150, 33-44.
17. Arthur, T.M., Ahmed, R., Chase-Topping, M., Kalchayanand, N., Schmidt, J.W., Bono, J.L. 2013. Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from supershedding cattle. Applied and Environmental Microbiology 79, 4294-4303.
18. Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S., Collins, M.D. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. Letters in Applied Microbiology 13, 202-206.
19. Ashton, D., Bernard, D. 1992. Thermophilic anaerobic sporeformers. In: Vanderzantz, C., Splittstoesser, D.F., (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd Edition. American Public Health Association, Washington, D.C. 309-316.
20. Autio, T., Keto-Timonen, R., Lunden, J., Bjorkroth, J., Korkeala, H. 2003. Characterisation of persistent and sporadic *Listeria monocytogenes* strains by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and amplified fragment length polymorphism (AFLP). Systematic and Applied Microbiology 26, 539-545.
21. Aznar, R., Alarcón, B. 2002. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers. Systematic and Applied Microbiology 25, 109-119.
22. Bailey-Smith, K., Todd, S.J., Southworth, T.W., Proctor, J., Moir, A. 2005. The ExsA protein of *Bacillus cereus* is required for assembly of coat and exosporium onto the spore surface. Journal of Bacteriology 187, 3800-3806.
23. Baillie, L., Hibbs, S., Tsai, P., Cao, G.L., Rosen, G.M. 2005. Role of superoxide in the germination of *Bacillus anthracis* endospores. Fems Microbiology Letters 245, 33-38.
24. Balk, M., Weijma, J., Friedrich, M.W., Stams, A.J.M. 2003. Methanol utilization by a novel thermophilic homoacetogenic bacterium, *Moorella mulderi* sp nov., isolated from a bioreactor. Archives of Microbiology 179, 315-320.
25. Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., El Jabri, M., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P. 2012. Sporulation boundaries and spore formation kinetics of *Bacillus* spp. as a function of temperature, pH and  $a_w$ . Food Microbiology 32, 79-86.
26. Baril, E., Coroller, L., Postollec, F., Leguerinel, I., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P. 2011. The wet-heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores produced in a two-

step sporulation process depends on sporulation temperature but not on previous cell history. *International Journal of Food Microbiology* 146, 57-62.

27. Baumann, L., Okamoto, K., Unterman, B.M., Lynch, M.J., Baumann, P. 1984. Phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 44, 329-341.

28. Bender, G.R., Marquis, R.E. 1985. Spore heat-resistance and specific mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 50, 1414-1421.

29. Bigelow, W.D. 1921. The logarithmic nature of thermal death time curves. *The Journal of Infectious Diseases* 29, 528-536.

30. Bikandi, J., Millán, R.S., Rementeria, A., Garaizar, J. 2004. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics* 20, 798-799.

31. Birch, M., Denning, D., Law, D. 1996 Rapid genotyping of *Escherichia coli* O157 isolates by random amplification of polymorphic DNA. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15, 297-302.

32. Bock, S.A., Fox, S.L., Gibbons, W.R. 1997. Development of a low-cost, industrially suitable medium for the production of acetic acid from *Clostridium thermoaceticum*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 25, 117-125.

33. Botstein, D., White, R., Skolnick, M., Davis, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32, 314-331.

34. Bozue, J., Moody, K.L., Cote, C.K., Stiles, B.G., Friedlander, A.M., Welkos, S.L., Hale, M.L. 2007. *Bacillus anthracis* spores of the bcLA mutant exhibit increased adherence to epithelial cells, fibroblasts, and endothelial cells but not to macrophages. *Infection and Immunity* 75, 4498-4505.

35. Brumlik, M.J., Szymajda, U., Zakowska, D., Liang, X., Redkar, R.J., Patra, G., Del Vecchio, V.G. 2001. Use of Long-Range Repetitive Element Polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3021-3028.

36. Burgess, S.A., Flint, S.H., Lindsay, D. 2013. Characterization of thermophilic bacilli from a milk powder processing plant. *Journal of Applied Microbiology*.

37. Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology* 144, 215-225.

38. Burkholder, W.F., Grossman, A.D. 2000. Regulation of the initiation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. In: Brun, Y.V., Shimkets, L.J., (Eds.), *Prokaryotic Development*. ASM Press, Washington DC.

39. Byrer, D.E., Rainey, F.A., Wiegand, J. 2000. Novel strains of *Moorella thermoacetica* form unusually heat-resistant spores. *Archives in Microbiology* 174, 334-339.



40. Byun, S.K., Jung, S.C., Yoo, H.S. 2001. Random amplification of polymorphic DNA typing of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology* 69, 227-235.
41. Caballero, A., Garcia-Pereira, M.J., Quesada, H. 2013. Genomic distribution of AFLP markers relative to gene locations for different eukaryotic species. *BMC Genomics* 14, 528.
42. Cano, R.J., Borucki, M.K. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. *Science* 268, 1060-1064.
43. Carlier, J.-P., Bedora-Faure, M. 2006. Phenotypic and genotypic characterization of some *Moorella* sp. strains isolated from canned foods. *Systematic and Applied Microbiology* 29, 581-588.
44. Carlier, J.-P., Bonne, I., Bedora-Faure, M. 2006. Isolation from canned foods of a novel *Thermoanaerobacter* species phylogenetically related to *Thermoanaerobacter mathranii* (Larsen 1997): Emendation of the species description and proposal of *Thermoanaerobacter mathranii* subsp. *Alimentarius* subsp. *Nov.* *Anaerobe* 12, 153-159.
45. Carlin, F. 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology* 28, 177-182.
46. Carlin, F., Fricker, M., Pielaat, A., Heisterkamp, S., Shaheen, R., Salkinoja Salonen, M., Svensson, B., Nguyen-the, C., Ehling-Schulz, M. 2006. Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology* 109, 132-138.
47. Caspers, M.P.M., Schuren, F.H., van Zuijlen, A.C.M., Brul, S., Montijn, R.C., Abee, T., Kort, R. 2012. A mixed-species microarray for identification of food spoilage bacilli. *Food Microbiology* 28, 245-251.
48. Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F., ter Steeg, P.F. 2001. Effect of sporulation and recovery medium on the heat resistance and amount of injury of spores from spoilage bacilli. *Journal of Applied Microbiology* 90, 761-770.
49. Chang, K.M., Huang, W.C., Chiou, C.S., Shen, G.H., Huang, C.C., Wen, F.S. 2013. Suitable restriction enzyme for standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocol and interlaboratory comparison of *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Immunol Infect* 46, 195-201.
50. Chen, K.-W., Lo, H.-J., Lin, Y.-H., Li, S.-Y. 2005. Comparison of four molecular typing methods to assess genetic relatedness of *Candida albicans* clinical isolates in Taiwan. *Journal of Medical Microbiology* 54, 249-258.
51. Cheng, L., Mu, W., Jiang, B. 2009. Thermostable L-arabinose isomerase from *Bacillus stearothermophilus* IAM 11001 for D-tagatose production: gene cloning, purification and characterisation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 1327-1333.
52. Cheryan, M., Parekh, S., Shah, M., Witjitra, K. 1997. Production of acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*. *Advances in Applied Microbiology* 43, 1-33.

53. Chiang, Y.C., Tsen, H.Y., Chen, H.Y., Chang, Y.H., Lin, C.K., Chen, C.Y., Pai, W.Y. 2012. Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp. and *Pseudomonas fluorescens* in milk and meat samples. *Journal of Microbiological Methods* 88, 110-116.
54. Chou, H.H., Chiou, C.S., Chen, K.W., Li, S.Y. 2007. Suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Candida tropicalis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 57, 451-454.
55. Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C., Comi, G. 2005. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *International Journal of Food Microbiology* 103, 167-178.
56. Collins, M.D., Lawson, P.A., Willems, A., Cordoba, J.J., Fernandezgarayzabal, J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J.A.E. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium* - proposal of 5 new genera and 11 new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 812-826.
57. Condon, S., Bayarte, M., Sala, F.J. 1992. Influence of the sporulation temperature upon the heat-resistance of *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology* 73, 251-256.
58. Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., De Vos, P., Heyndrickx, M. 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology* 31, 126-140.
59. Coorevits, A., Dinsdale, A.E., Halket, G., Lebbe, L., De Vos, P., Van Landschoot, A., Logan, N.A. 2012. Taxonomic revision of the genus *Geobacillus*: emendation of *Geobacillus*, *G. stearothermophilus*, *G. jurassicus*, *G. toebii*, *G. thermodenitrificans* and *G. thermoglucosidans* (nom. corrig., formerly 'thermoglucosidasius'); transfer of *Bacillus thermantarcticus* to the genus as *G. thermantarcticus* comb. nov.; proposal of *Caldibacillus debilis* gen. nov., comb. nov.; transfer of *G. tepidamans* to *Anoxybacillus* as *A. tepidamans* comb. nov.; and proposal of *Anoxybacillus caldiproteolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 1470-1485.
60. Coroller, L., Leguérinel, I., Mafart, P. 2001. Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 317-322.
61. Coroller, L., Leguérinel, I., Mettler, E., Savy, N., Mafart, P. 2006. General model, based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 6493-6502.
62. Cortezzo, D.E., Setlow, P. 2005. Analysis of factors that influence the sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* to DNA damaging chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 98, 606-617.
63. Coton, M., Denis, C., Cadot, P., Coton, E. 2011. Biodiversity and characterization of aerobic spore-forming bacteria in surimi seafood products. *Food Microbiology* 28, 252-260.

64. Couvert, O., Gaillard, S., Savy, N., Mafart, P., Leguerinel, I. 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. *International Journal of Food Microbiology* 101, 73-81.
65. Cowan, A.E., Olivastro, E.M., Koppel, D.E., Loshon, C.A., Setlow, B., Setlow, P. 2004. Lipids in the inner membrane of dormant spores of *Bacillus* species are largely immobile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 7733-7738.
66. Cramton, S.E., Schnell, N.F., Gotz, F., Bruckner, R. 2000. Identification of a new repetitive element in *Staphylococcus aureus*. *Infection and Immunity* 68, 2344-2348.
67. CTCPA. 2005. Guide de bonnes pratiques pour l'établissement de barèmes de traitement thermique. *Information Technique* 234.
68. Daniel, S.L., Hsu, T., Dean, S.I., Drake, H.L. 1990. Characterisation of the H<sub>2</sub>-dependent and co-dependent chemolithotrophic potentials of the acetogens *Clostridium thermoaceticum* and *Acetogenium kivui*. *Journal of Bacteriology* 172, 4464-4471.
69. Das, A., Silaghi-Dumitrescu, R., Ljungdahl, L.G., Kurtz, D.M. 2005. Cytochrome bd oxidase, oxidative stress, and dioxygen tolerance of the strictly anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*. *Journal of Bacteriology* 187, 2020-2029.
70. de Beer, J.L., van Ingen, J., de Vries, G., Erkens, C., Sebek, M., Mulder, A., Sloot, R., van den Brandt, A.M., Enaimi, M., Kremer, K., Supply, P., van Soolingen, D. 2013. Comparative study of *IS6110* restriction fragment length polymorphism and variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in the Netherlands, based on a 5-year nationwide survey. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 1193-1198.
71. de Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 2180-2187.
72. de Clerck, E., Devos, J., de Vos, P. 2004a. Molecular characterisation of bacterial contamination in semi-final gelatine extracts, using denaturing gradient gel electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 612-619.
73. de Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Forsyth, G., Lebbe, L., Logan, N.A., DeVos, P. 2004b. Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 50-60.
74. Décret. n°55-241 (1955). Décret pris pour l'application en ce qui concerne le commerce des conserves et semi conserves alimentaires de la loi du 1er août 1905 modifiée et complétée sur la répression des fraudes: Version consolidée au 03 avril 1997.
75. Denny, C.B., Corlett, D.A.J. 1992. Canned foods - Tests for cause of spoilage. In: Splittstoesser, C.V.a.D.F., (Ed.), *Compendium of methods for the microbiological*

examination of foods, 3rd Edition. American Public Health Association, Washington, D.C. 1051-1092.

76.Dhaisne, A., Guellerin, M., Laroute, V., Laguerre, S., Cocaïgn-Bousquet, M., Le Bourgeois, P., Loubiere, P. 2013. Genotypic and phenotypic analysis of dairy *Lactococcus lactis* biodiversity in milk: Volatile organic compounds as discriminating markers. Applied and Environmental Microbiology 79, 4643-4652.

77.Dhakal, R., Chauhan, K., Seale, R.B., Deeth, H.C., Pillidge, C.J., Powell, I.B., Craven, H., Turner, M.S. 2013. Genotyping of dairy *Bacillus licheniformis* isolates by high resolution melt analysis of multiple variable number tandem repeat loci. Food Microbiology 34, 344-351.

78.Dinsdale, A.E., Halket, G., Coorevits, A., Van Landschoot, A., Busse, H.-J., De Vos, P., Logan, N.A. 2011. Emended descriptions of *Geobacillus thermoleovorans* and *Geobacillus thermocatenulatus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 61, 1802-1810.

79.Dlugokenski, R.E., Sella, S.R., Guizelini, B.P., Vandenberghe, L.P., Woiciechowski, A.L., Socol, C.R., Minozzo, J.C. 2011. Use of soybean vinasses as a germinant medium for a *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 sterilization biological indicator. Applied Microbiology and Biotechnology 90, 713-719.

80.Dodds, K.L. 1993. *Clostridium botulinum* in the environment. In: Hauschild, A.H.W., Dodds, K.L., (Eds.), *Clostridium botulinum*. Ecology and Control in Food. Marcel Dekker, New York. 21-52.

81.Donk, P.J. 1920. A highly resistant thermophilic organism Journal of Bacteriology 5, 373-374.

82.Dotzauer, C., Ehrmann, M., Vogel, R. 2002. Occurrence and detection of *Thermoanaerobacterium* and *Thermoanaerobacter* in canned food. Food Technology and Biotechnology 40, 21-26.

83.Drake, H.L., Gossner, A.S., Daniel, S.L. 2008. Old acetogens, new light. In: Wiegel, J., Maier, R.J., Adams, M.W.W., (Eds.), Incredible Anaerobes: From Physiology to Genomics to Fuels, vol. 1125. Blackwell Publishing, Oxford. 100-128.

84.Drancourt, M., Roux, V., Dang, L.V., Tran-Hung, L., Castex, D., Chenal-Francisque, V., Ogata, H., Fournier, P.E., Crubezy, E., Raoult, D. 2004. Genotyping, orientalis-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. Emerging Infectious Diseases 10, 8.

85.Driks, A. 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63, 1-20.

86.Durand, L., Planchon, S., Guinebretiere, M.-H., Carlin, F., Remize, F. 2014. Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*. Food Microbiology.

87. Eneroth, A., Ahrne, S., Molin, G. 2000. Contamination routes of Gram-negative spoilage bacteria in the production of pasteurised milk, evaluated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *International Dairy Journal* 10, 325-331.
88. Eneroth, A., Svensson, B., Molin, G., Christiansson, A. 2001. Contamination of pasteurized milk by *Bacillus cereus* in the filling machine. *Journal of Dairy Research* 68, 189-196.
89. Esty, J.R., Meyer, K.F. 1922. The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. *Journal of Infectious Diseases* 31, 650-663.
90. Faille, C., Lequette, Y., Ronse, A., Slomianny, C., Garenaux, E., Guerardel, Y. 2010. Morphology and physico-chemical properties of *Bacillus* spores surrounded or not with an exosporium. Consequences on their ability to adhere to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 143, 125-135.
91. Farkas, J. 2000. Spices and herbs. In: Lund, B.M., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W., (Eds.), *The Microbiological Quality and Safety of Food*. Aspen Publishers, Gaithersburg. 897-918.
92. Farkas, J. 2007. Physical methods of food preservation, *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. 685-712.
93. FDA. 2007. Food and Drug Administration, Guidance for industry and FDA staff - biological indicator (BI) intended to monitor sterilizers used in health care facilities: remarket notification [510(k)] Submissions.
94. Feberwee, A., Dijkstra, J.R., von Banniseht-Wysmuller, T.E., Gielkens, A.L., Wagenaar, J.A. 2005. Genotyping of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analysis and digitalized Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Veterinary Microbiology* 111, 125-131.
95. Fegan, N., Blackall, P.J., Pahoff, J.L. 1995. Phenotypic characterisation of *Pasteurella multocida* isolates from Australian poultry. *Veterinary Microbiology* 47, 281-286.
96. Feig, S., Stersky, A.K. 1981. Characterization of a heat-resistant strain of *Bacillus coagulans* isolated from cream style canned corn. *Journal of Food Science* 46, 135-137.
97. Felix, B., Niskanen, T., Vingadassalon, N., Dao, T.T., Assere, A., Lombard, B., Brisabois, A., Roussel, S. 2013. Pulsed-field gel electrophoresis proficiency testing trials: Toward European harmonization of the typing of food and clinical strains of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 873-881.
98. Fellow, P. 1996. *Food Processing Technology. Principles and practice* Woodhead Publishing Series in Food Science and Technology, Cambridge, UK.
99. Fernandez, P.S., Gomez, F.J., Ocio, M.J., Rodrigo, M., Sanchez, T., Martinez, A. 1995. D value of *Bacillus stearothermophilus* spores as function of pH and recovery medium acidulant. *Journal of Food Protection* 58, 628-632.

100. Fontaine, F.E., Peterson, W.H., McCoy, E., Johnson, M.J., Ritter, G.J. 1942. A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology* 43, 701-715.
101. Foster, S.J. 1994. The role and regulation of cell-wall structural dynamics during differentiation of endospore-forming bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 76, S25-S39.
102. Foucault, C., La Scola, B., Lindroos, H., Andersson, S.G.E., Raoult, D. 2005. Multispacer typing technique for sequence-based typing of *Bartonella quintana*. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 41-48.
103. Fournier, P.E., Zhu, Y., Ogata, H., Raoult, D. 2004. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5757-5766.
104. Gaillard, M., Pradervand, N., Minoia, M., Sentchilo, V., Johnson, D.R., van der Meer, J.R. 2010. Transcriptome analysis of the mobile genome ICEclc in *Pseudomonas knackmussii* B13. *Bmc Microbiology* 10.
105. Galperin, M.Y., Mekhedov, S.L., Puigbo, P., Smirnov, S., Wolf, Y.I., Rigden, D.J. 2012. Genomic determinants of sporulation in *Bacilli* and *Clostridia*: towards the minimal set of sporulation-specific genes. *Environmental Microbiology* 14, 2870-2890.
106. Gan, E., Smooker, P.M., Coloe, P.J. 2010. Molecular typing of *Salmonella enterica* serovar Sofia in Australia by pulsed-field gel electrophoresis and repetitive element PCR typing. *Journal of Applied Microbiology* 109, 292-303.
107. Garaizar, J., Rementeria, A., Porwollik, S. 2006. DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunol Med Microbiol* 47, 178-189.
108. Garcia-Alvarado, J.S., Labbe, R.G., Rodriguez, M.A. 1992. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43 degrees C. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 1411-1414.
109. Garcia-Pereira, M.J., Caballero, A., Quesada, H. 2010. Evaluating the relationship between evolutionary divergence and phylogenetic accuracy in AFLP data sets. *Molecular Biology and Evolution* 27, 988-1000.
110. Gasperov, N.M., Sabol, I., Matovina, M., Spaventi, S., Grce, M. 2008. Detection and typing of human papillomaviruses combining different Methods: polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism, line probe assay and sequencing. *Pathology & Oncology Research* 14, 355-363.
111. GBPH. 1999. Guide des Bonnes Pratiques d'Hygiène. Fabrication des conserves de produits végétaux appertisés.
112. Geeraerd, A.H., Herremans, C.H., Van Impe, J.F. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *Int J Food Microbiol* 59, 185-209.

113. Geeraerd, A.H., Valdramidis, V.P., Van Impe, J.F. 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *Int J Food Microbiol* 102, 95-105.
114. Gerhardt, P., Marquis, R.E. 1989. Spore thermoresistance mechanisms. In: Smith, I., Slepecky, R.A., Setlow, P., (Eds.), *Regulation of Prokaryotic Development*. DC: American Society for Microbiology, Washington. 43-63.
115. Gerner-Smidt, P., Hise, K., Kincaid, J., Hunter, S., Rolando, S., Hyytia-Trees, E., Ribot, E.M., Swaminathan, B., PulseNet, T. 2006a. PulseNet USA: A five-year update. *Foodborne Pathogens and Disease* 3, 9-19.
116. Gerner-Smidt, P., Scheutz, F., Study, P. 2006b. Standardized pulsed-field gel electrophoresis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: The PulseNet Europe feasibility study. *Foodborne Pathogens and Disease* 3, 74-80.
117. Ghosh, S., Zhang, P.F., Li, Y.Q., Setlow, P. 2009. Superdormant spores of *Bacillus* species have elevated wet-heat resistance and temperature requirements for heat activation. *Journal of Bacteriology* 191, 5584-5591.
118. Gibson, T., Gordon, R.E. 1974. The Genus *Bacillus*. In: Buchanan, R., Gibbons, N., (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore. 529-550.
119. Giffel, M.C.T., Wagendorp, A., Herrewegh, A., Driehuis, F. 2002. Bacterial spores in silage and raw milk. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81, 625-630.
120. Gilson, E., Clement, J.M., Brutlag, D., Hofnung, M. 1984. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *EMBO Journal* 3, 1417-1421.
121. Giraffa, G., Lazzi, C., Gatti, M., Rossetti, L., Mora, D., Neviani, E. 2003. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *International Journal of Food Microbiology* 82, 163-172.
122. Golezi, F., Brignatz, J., Bellenfant, M., Raoult, D., Drancourt, M. 2013. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing outbreak in a school in Marseille, France, 2012. *Eurosurveillance* 18, 11-12.
123. Gordon, R.E., Smith, N.R. 1949. Aerobic sporeforming bacteria capable of growth at high temperatures. *Journal of Bacteriology* 58, 327-341.
124. Gossner, A.S., Devereux, R., Ohnemuller, N., Acker, G., Stackebrandt, E., Drake, H.L. 1999. *Thermicanus aegyptius* gen. nov., sp nov., isolated from oxic soil, a fermentative microaerophile that grows commensally with the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5124-5133.
125. Goujon, M., McWilliam, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., Lopez, R. 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* 38, W695-W699.

126. Gould, G.W. 2006. History of science--spores. *Journal of Applied Microbiology* 101, 507-513.
127. Green, E., Obi, L.C., Okoh, A.I., Nchabeleng, M., de Villiers, B.E., Letsoalo, T., Hoosen, A.A., Bessong, P.O., Ndip, R.N. 2013. *IS6110* Restriction fragment length polymorphism typing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Northeast South Africa. *Journal of Health Population and Nutrition* 31, 1-10.
128. Griffiths, K.K., Setlow, P. 2009. Effects of modification of membrane lipid composition on *Bacillus subtilis* sporulation and spore properties. *Journal of Applied Microbiology* 106, 2064-2078.
129. Grissa, I., Bouchon, P., Pourcel, C., Vergnaud, G. 2008. On-line resources for bacterial micro-evolution studies using MLVA or CRISPR typing. *Biochimie* 90, 660-668.
130. Groenewald, W.H., Gouws, P.A., Witthuhn, R.C. 2009. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestriis* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology* 26, 71-76.
131. Guerra, M.M., Bernardo, F., McLauchlin, J. 2002. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Listeria monocytogenes*. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 456-461.
132. Guillaume-Gentil, O., Scheldeman, P., Marugg, J., Herman, L., Joosten, H., Heyndrickx, M. 2002. Genetic heterogeneity in *Bacillus sporothermodurans* as demonstrated by ribotyping and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4216-4224.
133. Guinebretiere, M., Auger, S., Galleron, N., Contzen, M., De Sarrau, B., De Buyser, M.L., Lamberet, G., Fagerlund, A., Granum, P.E., Lereclus, D., De Vos, P., Nguyen-The, C., Sorokin, A. 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp nov is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* Group occasionally associated with food poisoning. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63, 31-40.
134. Guinebretiere, M., Berge, O., Normand, P., Morris, C., Carlin, F., Nguyen-The, C. 2001. Identification of bacteria in pasteurized zucchini purées stored at different temperatures and comparison with those found in other pasteurized vegetable purées. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4520-4530.
135. Guinebretiere, M., Girardin, H., Dargaignaratz, C., Carlin, F., Nguyen-The, C. 2003. Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. *International Journal of Food Microbiology* 82, 223-232.
136. Guinebretiere, M., Nguyen-The, C. 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 207-215.
137. Guinebretiere, M., Thompson, F.L., Sorokin, A., Normand, P., Dawyndt, P., Ehling-Schulz, M., Svensson, B., Sanchis, V., Nguyen-The, C., Heyndrickx, M., De Vos, P. 2008.



- Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. Environmental Microbiology 10, 851-865.
138. Guizelini, B., Vandenberghe, L.S., Sella, S.R., Soccol, C. 2012. Study of the influence of sporulation conditions on heat resistance of *Geobacillus stearothermophilus* used in the development of biological indicators for steam sterilization. Archives of Microbiology 194, 991-999.
139. Gzyl, A., Augustynowicz, E., Mosiej, E., Zawadka, M., Gniadek, G., Nowaczek, A., Slusarczyk, J. 2005. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) versus randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) as new tools for inter- and intra-species differentiation within *Bordetella*. Journal of Medical Microbiology 54, 333-346.
140. Hacia, J.G. 1999. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. Nature Genetics 21, 42-47.
141. Haguenoer, E., Baty, G., Pourcel, C., Lartigue, M.F., Domelier, A.S., Rosenau, A., Quentin, R., Mereghetti, L., Lanotte, P. 2011. A multi locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) scheme for *Streptococcus agalactiae* genotyping. BMC Microbiology 11.
142. Hedberg, C.W., Besser, J.M. 2006. Commentary: Cluster evaluation, PulseNet, and public health practice. Foodborne Pathogens and Disease 3, 32-35.
143. Henderson, I., Duggleby, C.J., Turnbull, P.C.B. 1994. Differentiation of *Bacillus anthracis* from Other *Bacillus cereus* Group Bacteria with the PCR. International Journal of Systematic Bacteriology 44, 99-105.
144. Henssge, U., Do, T., Gilbert, S.C., Cox, S., Clark, D., Wickstrom, C., Ligtenberg, A.J.M., Radford, D.R., Beighton, D. 2011. Application of MLST and pilus gene sequence comparisons to investigate the population structures of *Actinomyces naeslundii* and *Actinomyces oris*. Plos One 6.
145. Herschleb, J., Ananiev, G., Schwartz, D.C. 2007. Pulsed-field gel electrophoresis. Nature Protocols 2, 677-684.
146. Hong, H.A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M. 2009. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. Research in Microbiology 160, 375-379.
147. Hornstra, L.M., Ter Beek, A., Smelt, J.P., Kallemeijn, W.W., Brul, S. 2009. On the origin of heterogeneity in (preservation) resistance of *Bacillus* spores: input for a 'systems' analysis approach of bacterial spore outgrowth. International Journal of Food Microbiology 134, 9-15.
148. Hornung, R.W., Reed, L.D. 1990. Estimation of average concentration in the presence of nondetectable values. Applied Occupational and Environmental Hygiene 5, 46-51.
149. Hullo, M.F., Moszer, I., Danchin, A., Martin-Verstraete, I. 2001. CotA of *Bacillus subtilis* is a copper-dependent laccase. Journal of Bacteriology 183, 5426-5430.
150. Hulton, C.S.J., Higgins, C.F., Sharp, P.M. 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. Molecular Microbiology 5, 825-834.

151. Iciek, J., Papiewska, A., Molska, M. 2006. Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during, thermal processing. *Journal of Food Engineering* 77, 406-410.
152. Inan, K., Bektas, Y., Canakci, S., Belduz, A.O. 2011. Use of *rpoB* sequences and rep-PCR for phylogenetic study of *Anoxybacillus* species. *Journal of Microbiology* 49, 782-790.
153. Jin, L.D., Lee, D.S., Shin, E.K., Kim, S.J., Jung, R., Hahn, T.W. 2006. Molecular typing by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and detection of virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Gallinarum biovar gallinarum. *Journal of Veterinary Medical Science* 68, 6.
154. Jonas, D., Spitzmuller, B., Daschner, F.D., Verhoef, J., Brisse, S. 2004. Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of amplified fragment length polymorphism. *Research in Microbiology* 155, 17-23.
155. Kalogridou-Vassiliadou, D. 1992. Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. *Journal of dairy science* 75, 2681-2686.
156. Kanduma, E., McHugh, T.D., Gillespie, S.H. 2003. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. *Journal of Applied Microbiology* 94, 781-791.
157. Karnholz, A., Kusel, K., Gossner, A., Schramm, A., Drake, H.L. 2002. Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1005-1009.
158. Katara, J., Deshmukh, R., Singh, N.K., Kaur, S. 2012. Molecular typing of native *Bacillus thuringiensis* isolates from diverse habitats in India using REP-PCR and ERIC-PCR analysis. *Journal of General and Applied Microbiology* 58, 83-94.
159. Katzin, L.I., Sandholzer, L.A., Strong, M.E. 1943. Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization. *Journal of Bacteriology* 45, 265-272.
160. Kaur, J., Ledward, D.A., Park, R.W., Robson, R.L. 1998. Factors affecting the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 26, 325-330.
161. Keim, P., Price, L.B., Klevytska, A.M., Smith, K.L., Schupp, J.M., Okinaka, R., Jackson, P.J., Hugh-Jones, M.E. 2000. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 182, 2928-2936.
162. Keto-Timonen, R., Heikinheimo, A., Eerola, E., Korkeala, H. 2006. Identification of *Clostridium* species and DNA fingerprinting of *Clostridium perfringens* by amplified fragment length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 4057-4065.
163. Keto-Timonen, R., Nevas, M., Korkeala, H. 2005. Efficient DNA Fingerprinting of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1148-1154.

164. Keto-Timonen, R.O., Autio, T.J., Korkeala, H.J. 2003. An improved amplified fragment length polymorphism (AFLP) protocol for discrimination of *Listeria* isolates. *Systematic and Applied Microbiology* 26, 236-244.
165. Killgore, G., Thompson, A., Johnson, S., Brazier, J., Kuijper, E., Pepin, J., Frost, E.H., Savelkoul, P., Nicholson, B., van den Berg, R.J., Kato, H., Sambol, S.P., Zukowski, W., Woods, C., Limbago, B., Gerding, D.N., McDonald, L.C. 2008. Comparison of seven techniques for typing international epidemic strains of *Clostridium difficile*: restriction endonuclease analysis, pulsed-field gel electrophoresis, PCR-ribotyping, multilocus sequence typing, multilocus variable-number tandem-repeat analysis, amplified fragment length polymorphism, and surface layer protein A gene sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 431-437.
166. Kim, H., Hahn, M., Grabowski, P., McPherson, D.C., Otte, M.M., Wang, R., Ferguson, C.C., Eichenberger, P., Driks, A. 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Molecular Microbiology* 59, 487-502.
167. Kivioja, T., Arvas, M., Saloheimo, M., Penttila, M., Ukkonen, E. 2005. Optimization of cDNA-AFLP experiments using genomic sequence data. *Bioinformatics* 21, 2573-2579.
168. Klobutcher, L.A., Ragkousi, K., Setlow, P. 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat provides "eat resistance" during phagocytic predation by the protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 103, 165-170.
169. Koesnandar, Nishio, N., Nagai, S. 1991. Effects of trace-metal ions on the growth, homoacetogenesis and corrinoid production by *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71, 181-185.
170. Koeuth, T., Versalovic, J., Lupski, J.R. 1995. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research* 5, 408-418.
171. Korza, G., Setlow, P. 2012. Topology and accessibility of germination proteins in the *Bacillus subtilis* spore inner membrane. *Journal of Bacteriology* 195, 1484-1491.
172. Kuisienė, N., Raugalas, J., Čitavičius, D. 2008. Comparative sequence analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacers of the genus *Geobacillus*. *Biologija* 54, 1-6.
173. Kupradit, C., Rodtong, S., Ketudat-Cairns, M. 2013. Development of a DNA microarray for simultaneous detection of multiple foodborne pathogenic bacteria in fresh chicken meat. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 29, 2281-2291.
174. Lai, E., Birren, B.W., Clark, S.M., Simon, M.I., Hood, L. 1989. Pulsed field gel electrophoresis. *Biotechniques* 7, 34-42.
175. Lai, E.M., Phadke, N.D., Kachman, M.T., Giorno, R., Vazquez, S., Vazquez, J.A., Maddock, J.R., Driks, A. 2003. Proteomic analysis of the spore coats of *Bacillus subtilis* and *Bacillus anthracis*. *Journal of Bacteriology* 185, 1443-1454.

- 176.Laidler, M.R., Tourdjman, M., Buser, G.L., Hostetler, T., Repp, K.K., Leman, R., Samadpour, M., Keene, W.E. 2013. *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of locally grown strawberries contaminated by deer. *Clinical Infectious Diseases* 57, 1129-1134.
- 177.Lanier, W.A., Leeper, M.M., Smith, K.E., Tillman, G.E., Holt, K.G., Gerner-Smidt, P. 2009. Pulsed-field gel electrophoresis subtypes of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 isolated from ground beef and humans, United States, 2001-2006. *Foodborne Pathogens and Disease* 6, 1075-1082.
- 178.Latimer, J.M., Matsen, J.M. 1977. Microwave oven irradiation as a method for bacterial decontamination in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 6, 340-342.
- 179.Le Fleche, P., Hauck, Y., Onteniente, L., Prieur, A., Denoeud, F., Ramisse, V., Sylvestre, P., Benson, G., Ramisse, F., Vergnaud, G. 2001. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *Bmc Microbiology* 1, 2.
- 180.Le Fleche, P., Jacques, I., Grayon, M., Al Dahouk, S., Bouchon, P., Denoeud, F., Nockler, K., Neubauer, H., Guilloteau, L.A., Vergnaud, G. 2006. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *Bmc Microbiology* 6.
- 181.Lee, M.S., Lee, Y.S., Chiou, C.S. 2006. The suitable restriction enzymes for pulsed-field gel electrophoresis analysis of *Bordetella pertussis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 56, 217-219.
- 182.Leguerinel, I., Spegagne, I., Couvert, O., Gaillard, S., Mafart, P. 2005. Validation of an overall model describing the effect of three environmental factors on the apparent D-value of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 100, 223-229.
- 183.Li, W., Chomel, B.B., Maruyama, S., Guphill, L., Sander, A., Raoult, D., Fournier, P.E. 2006. Multispacer typing to study the genotypic distribution of *Bartonella henselae* population. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 8.
- 184.Li, W., Raoult, D., Fournier, P.E. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 892-916.
- 185.Li, W., Raoult, D., Rolain, J.M., La Scola, B. 2011. Evidence of circulation of an epidemic strain of *Francisella tularensis* in France by multispacer typing. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 30, 1135-1138.
- 186.Li, W.J., Raoult, D., Fournier, P.E. 2007. Genetic diversity of *Bartonella henselae* in human infection detected with multispacer typing. *Emerging Infectious Diseases* 13, 1178-1183.
- 187.Lindstedt, B.A. 2005. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. *Electrophoresis* 26, 2567-2582.
- 188.Lista, F., Faggioni, G., Valjevac, S., Ciammaruconi, A., Vaissaire, J., le Doujet, C., Gorge, O., De Santis, R., Carattoli, A., Ciervo, A., Fasanella, A., Orsini, F., D'Amelio, R., Pourcel, C., Cassone, A., Vergnaud, G. 2006. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based

on automated capillary 25-loci Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis. *Bmc Microbiology* 6, 33.

189.Ljungdahl, L.G. 1986. The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 40, 415-450.

190.Logan, N.A., De Vos, P. 2009. Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174<sup>AL</sup>. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume Three The Firmicutes* Springer, Dordrecht. 21-128.

191.Lopez, M., Gonzalez, I., Condon, S., Bernardo, A. 1996. Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 28, 405-410.

192.Lund, B.M. 1986. Anaerobes in relation to foods of plant origin. *Society for Applied Bacteriology symposium series* 13, 351-372.

193.Lundie, L.L., Jr., Drake, H.L. 1984. Development of a minimally defined medium for the acetogen *Clostridium thermoaceticum*. *Journal of Bacteriology* 159, 700-703.

194.Lunestad, B.T., Truong, T.T.T., Lindstedt, B.A. 2013. A multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) of *Listeria monocytogenes* isolated from Norwegian salmon-processing factories and from listeriosis patients. *Epidemiology and Infection* 141, 2101-2110.

195.Lupski, J.R., Weinstock, G.M. 1992. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology* 174, 4525-4529.

196.Lurlina, M.O., Saiz, A.I., Fuselli, S.R., Fritz, R. 2006. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *Food Science and Technology* 39, 105-110.

197.Lyoda, S., Wada, A., Weller, J., Flood, S.J.A., Schreiber, E., Tucker, B., Watanabe, H. 1999. Evaluation of AFLP, a high-resolution DNA fingerprinting method, as a tool for molecular subtyping of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 isolates. *Microbiology and Immunology* 43, 803-806.

198.Madhavan, H.N., Priya, K. 2002. Polymerase chain reaction based restriction fragment length polymorphism for the genotyping of cytomegalovirus (CMV) from patients with CMV disease in Chennai. *Indian Journal of Medical Research* 115, 242-247.

199.Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72, 107-113.

200.Mafart, P., Leguerinel, I., Couvert, O., Coroller, L. 2010. Quantification of spore resistance for assessment and optimization of heating processes: a never-ending story. *Food Microbiology* 27, 568-572.

201.Maiden, M.C.J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G. 1998. Multilocus

- sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 3140-3145.
202. Manzano, M., Giusto, C., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G. 2009. Molecular methods to evaluate biodiversity in *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains from different origins. *Food Microbiology* 26, 259-264.
203. Marchant, R., Banat, I.M., Rahman, T.J., Berzano, M. 2002. The frequency and characteristics of highly thermophilic bacteria in cool soil environments. *Environmental Microbiology* 4, 595-602.
204. Martin, V., Maldonado-Barragan, A., Moles, L., Rodriguez-Banos, M., del Campo, R., Fernandez, L., Rodriguez, J.M., Jimenez, E. 2012. Sharing of bacterial strains between breast milk and infant feces. *Journal of Human Lactation* 28, 36-44.
205. Matsuda, N., Masuda, H., Komaki, M., Matsumoto, N. 1982. Thermophilic, spore-forming, strict anaerobes isolated from spoiled canned "Shiruko" and coffee containing milk. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 23, 480-486.
206. Matsunari, O., Shiota, S., Suzuki, R., Watada, M., Kinjo, N., Murakami, K., Fujioka, T., Kinjo, F., Yamaoka, Y. 2012. Association between *Helicobacter pylori* virulence factors and gastroduodenal diseases in Okinawa, Japan. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 876-883.
207. Mazas, M., Lopez, M., Gonzalez, I., Bernardo, A., Martin, R. 1997. Effects of sporulation pH on the heat resistance and the sporulation of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* 25, 331-334.
208. McKenney, P.T., Driks, A., Eichenberger, P. 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology* 11, 33-44.
209. McKnight, I.C., Eiroa, M.N.U., Sant'Ana, A.S., Massaguer, P.R. 2010. *Alicyclobacillus acidoterrestris* in pasteurized exotic Brazilian fruit juices: Isolation, genotypic characterization and heat resistance. *Food Microbiology* 27, 1016-1022.
210. McLauchlin, J., Ripabelli, G., Brett, M.M., Threlfall, E.J. 2000. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *International Journal of Food Microbiology* 56, 21-28.
211. Mediannikov, O., Fenollar, F., Socolovschi, C., Diatta, G., Bassene, H., Molez, J.F., Sokhna, C., Trape, J.F., Raoult, D. 2010. *Coxiella burnetii* in Humans and Ticks in Rural Senegal. *Plos Neglected Tropical Diseases* 4, 8.
212. Mehndiratta, P.L., Bhalla, P., Ahmed, A., Sharma, Y.D. 2009. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by PCR-RFLP of SPA gene: A reference laboratory perspective. *Indian Journal of Medical Microbiology* 27, 116-122.
213. Meintanis, C., Chalkou, K.I., Kormas, K.A., Lymperopoulou, D.S., Katsifas, E.A., Hatzinikolaou, D.G., Karagouni, A.D. 2008. Application of *rpoB* sequence similarity analysis, REP-PCR and BOX-PCR for the differentiation of species within the genus *Geobacillus*. *Letters in Applied Microbiology* 46, 395-401.

214. Melles, D.C., van Leeuwen, W.B., Snijders, S.V., Horst-Kreft, D., Peeters, J.K., Verbrugh, H.A., van Belkum, A. 2007. Comparison of multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and amplified fragment length polymorphism (AFLP) for genetic typing of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods* 69, 371-375.
215. Melly, E., Genest, P.C., Gilmore, M.E., Little, S., Popham, D.L., Driks, A., Setlow, P. 2002. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *Journal of Applied Microbiology* 92, 1105-1115.
216. Miesfield R.L. 2000. Principle of pulse-field gel electrophoresis (PFGE), Tucson.
217. Moeller, R., Setlow, P., Reitz, G., Nicholson, W.L. 2009. Roles of small, acid-soluble spore proteins and core water content in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to environmental solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5202-5208.
218. Mohapatra, B.R., Broersma, K., Mazumder, A. 2007. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *Fems Microbiology Letters* 277, 98-106.
219. Moir, C.J., Murell, W.G., Richardson, K.C., Board, P.W. 2001. Commercially sterile foods. In: A.I.F.M, G., (Ed.), *Spoilage of Processed Food: Causes and Diagnosis* Australian Institute of Food Science and Technology Incorporated, Waterloo DC. 101-112.
220. Monot, M., Honore, N., Baliere, C., Ji, B., Sow, S., Brennan, P.J., Cole, S.T. 2008. Are Variable-Number Tandem Repeats appropriate for genotyping *Mycobacterium leprae*? *Journal of Clinical Microbiology* 46, 2291-2297.
221. Moretti, T.R., Baumstark, A.L., Defenbaugh, D.A., Keys, K.M., Smerick, J.B., Budowle, B. 2001. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: Performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *Journal of Forensic Sciences* 46, 647-660.
222. Mortimer, P., Arnold, C. 2001. FAFLP: last word in microbial genotyping? *Journal of Medical Microbiology* 50, 393-395.
223. Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol* 14, 389-394.
224. Nath, G., Maurya, P., Gulati, A.K. 2010. ERIC PCR and RAPD based fingerprinting of *Salmonella Typhi* strains isolated over a period of two decades. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 530-536.
225. Naze, F., Jouen, E., Randriamahazo, R.T., Simac, C., Laurent, P., Bleriot, A., Chiroleu, F., Gagnevin, L., Pruvost, O., Michault, A. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* outbreak linked to mineral water bottles in a neonatal intensive care unit: Fast typing by use of High-Resolution Melting Analysis of a Variable-Number Tandem-Repeat locus. *Journal of Clinical Microbiology* 48, 3146-3152.

226. Nazina, T.N., Sokolova, D.S., Grigoryan, A.A., Shestakova, N.M., Mikhailova, E.M., Poltarau, A.B., Tourova, T.P., Lysenko, A.M., Osipov, G.A., Belyaev, S.S. 2005. *Geobacillus jurassicus* sp nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum *Geobacillus* species reservoir, and the validation of the. Systematic and Applied Microbiology 28, 43-53.
227. Nazina, T.N., Tourova, T.P., Poltarau, A.B., Novikova, E.V., Grigoryan, A.A., Ivanova, A.E., Lysenko, A.M., Petrunyaka, V.V., Osipov, G.A., Belyaev, S.S., Ivanov, M.V. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 433-446.
228. Nguyen Thi Minh, H., Durand, A., Loison, P., Perrier-Cornet, J.M., Gervais, P. 2011. Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and high pressure. Applied Microbiology and Biotechnology 90, 1409-1417.
229. Nicholson, W., Fajardo-Cavazos, P., Rebeil, R., Slieman, T., Riesenman, P., Law, J., Xue, Y. 2002. Bacterial endospores and their significance in stress resistance. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 81, 27-32.
230. Nicholson, W.L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H.J., Setlow, P. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64, 548-572.
231. Ocio, M.J., Fernandez, P., Rodrigo, F., Martinez, A. 1996. Heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in alginate-mushroom puree mixture. International Journal of Food Microbiology 29, 391-395.
232. Oliveira, I.C.M., de Mattos, M.C., Pinto, T.A., Ferreira-Carvalho, B.T., Benchetrit, L.C., Whiting, A.A., Bohnsack, J.F., Figueiredo, A.M.S. 2006. Genetic relatedness between group B streptococci originating from bovine mastitis and a human group B streptococcus type V cluster displaying an identical pulsed-field gel electrophoresis pattern. Clinical Microbiology and Infection 12, 887-893.
233. Olson, K.E., Sorrells, K.M. 1992. Thermophilic flat sour sporeformers. In: Splittstoesser, C.V.a.D.F., (Ed.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd Edition. American Public Health Association, Washington, D.C. 299-308.
234. Oomes, S.J., van Zuijlen, A.C., Hehenkamp, J.O., Witsenboer, H., van der Vossen, J.M., Brul, S. 2007. The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. International Journal of Food Microbiology 120, 85-94.
235. Paidhungat, M., Ragkousi, K., Setlow, P. 2001. Genetic requirements for induction of germination of spores of *Bacillus subtilis* by Ca(2+)-dipicolinate. Journal of Bacteriology 183, 4886-4893.



236. Palop, A., Raso, J., Pagan, R., Condon, S., Sala, F.J. 1999. Influence of pH on heat resistance of spores of *Bacillus coagulans* in buffer and homogenized foods. *International Journal of Food Microbiology* 46, 243-249.
237. Parisi, A., Latorre, L., Normanno, G., Miccolupo, A., Fracalvieri, R., Lorusso, V., Santagada, G. 2010. Amplified fragment length polymorphism and multi-locus sequence typing for high-resolution genotyping of *Listeria monocytogenes* from foods and the environment. *Food Microbiology* 27, 101-108.
238. Parkhill, J., Sebaihia, M., Preston, A., Murphy, L.D., Thomson, N., Harris, D.E., Holden, M.T.G., Churcher, C.M., Bentley, S.D., Mungall, K.L., Cerdeno-Tarraga, A.M., Temple, L., James, K., Harris, B., Quail, M.A., Achtman, M., Atkin, R., Baker, S., Basham, D., Bason, N., Cherevach, I., Chillingworth, T., Collins, M., Cronin, A., Davis, P., Doggett, J., Feltwell, T., Goble, A., Hamlin, N., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., Leather, S., Moule, S., Norberczak, H., O'Neil, S., Ormond, D., Price, C., Rabinowitsch, E., Rutter, S., Sanders, M., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Simmonds, M., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Unwin, L., Whitehead, S., Barrell, B.G., Maskell, D.J. 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature Genetics* 35, 32-40.
239. Peck, M.W., Stringer, S.C., Carter, A.T. 2011. *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. *Food Microbiology* 28, 183-191.
240. Penna, T.C., Machoshvili, I.A., Ishii, M. 2003. Effect of media on spore yield and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105 -108, 287-294.
241. Penna, T.C., Machoshvili, I.A., Taqueda, M.E., Ferraz, C.A. 1998. *Bacillus stearothermophilus* sporulation response to different composition media. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 52, 198-208.
242. Penna, T.C.V., Machoshvili, I.A., Taqueda, M.E.S., Ishii, M. 2000. The effect of media composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 54, 398-412.
243. Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., Crandall, K.A. 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* 16, 38-53.
244. Periago, P.M., Fernandez, P.S., Ocio, M.J., Martinez, A. 1998. Apparent thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores recovered under anaerobic conditions. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung a-Food Research and Technology* 206, 63-67.
245. Pichel, M., Brengi, S.P., Cooper, K.L.F., Ribot, E.M., Al-Busaidy, S., Araya, P., Fernandez, J., Vaz, T.I., Kam, K.M., Morcos, M., Nielsen, E.M., Nadon, C., Pimentel, G., Perez-Gutierrez, E., Gerner-Smidt, P., Binsztein, N., Shigella Flexneri PulseNet, P.P. 2012. Standardization and international multicenter validation of a PulseNet Pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Shigella flexneri* isolates. *Foodborne Pathogens and Disease* 9, 418-424.

246. Pierce, E., Xie, G., Barabote, R.D., Saunders, E., Han, C.S., Detter, J.C., Richardson, P., Brettin, T.S., Das, A., Ljungdahl, L.G., Ragsdale, S.W. 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*). *Environmental Microbiology* 10, 2550-2573.
247. Planchon, S., Dargaignaratz, C., Levy, C., Ginies, C., Broussolle, V., Carlin, F. 2010. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10°C and 30°C display variations in their properties. *Food Microbiology* 28, 291-297.
248. PNNS. 2011. Programme national nutrition santé. Plan de santé publique visant à améliorer l'état de santé de la population en agissant sur l'un de ses déterminants majeurs : la nutrition.
249. Postollec, F., Mathot, A.-G., Bernard, M., Divanac'h, M.-L., Pavan, S., Sohier, D.I. 2012. Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology* 158, 1-8.
250. Prevost, S., Andre, S., Remize, F. 2010. PCR detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage. *Current Microbiology* 61, 525-533.
251. Quelle, L.S., Catalano, M. 2001. Efficacy of two DNA fingerprinting methods for typing *Acinetobacter baumannii* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 39, 215-223.
252. Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Versalovic, J.V., de Bruijn, F.J. 2008. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Kowalchuck, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D.L., van Elsas, J.D., (Eds.), *Molecular Microbial Ecology Manual*. the Netherlands: Springer, Dordrecht. 611-644.
253. Raso, J., Palop, A., Bayarte, M., Condón, S., Sala, F.J. 1995. Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). *Food Microbiology* 12, 357-361.
254. Redmond, C., Baillie, L.W., Hibbs, S., Moir, A.J., Moir, A. 2004. Identification of proteins in the exosporium of *Bacillus anthracis*. *Microbiology* 150, 355-363.
255. Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., Barrett, T.J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157 : H7 *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* 3, 59-67.
256. Ribot, E.M., Fitzgerald, C., Kubota, K., Swaminathan, B., Barrett, T.J. 2001. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1889-1894.
257. Rigaux, C., Denis, J.-B., Albert, I., Carlin, F. 2013. A meta-analysis accounting for sources of variability to estimate heat resistance reference parameters of bacteria using hierarchical Bayesian modeling: Estimation of  $D$  at 121.1°C and pH 7,  $z_T$  and  $z_{pH}$  of *Geobacillus stearothermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* 161, 112-120.

- 258.Rivero, C.W., De Benedetti, E.C., Sambeth, J.E., Lozano, M.E., Trelles, J.A. 2012. Biosynthesis of anti-HCV compounds using thermophilic microorganisms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 6059-6062.
- 259.Rodrigo, F., Rodrigo, C., Fernandez, P.S., Rodrigo, M., Martinez, A. 1999. Effect of acidification and oil on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores heated in food substrate. *International Journal of Food Microbiology* 52, 197-201.
- 260.Roetzer, A., Schuback, S., Diel, R., Gasau, F., Ubben, T., di Nauta, A., Richter, E., Rusch-Gerdes, S., Niemann, S. 2012. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* typing methods in a 4-year study in Schleswig-Holstein, Northern Germany. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 4173-4178.
- 261.Rombauts, S., Van De Peer, Y., Rouze, P. 2003. AFLP *insilico*, simulating AFLP fingerprints. *Bioinformatics* 19, 776-777.
- 262.Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Rückert, A., Morgan, H.W. 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology* 85, 45-61.
- 263.Rossetti, L., Giraffa, G. 2005. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiology Methods* 63, 135-144.
- 264.Rowe, J.J., Goldberg, I.D., Amelunxen, R.E. 1975. Development of defined and minimal media for the growth of *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* 124, 279-284.
- 265.Rückert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W. 2004. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology* 96, 263-272.
- 266.Rueckert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W. 2005. Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. *Journal of Microbiological Methods* 60, 155-167.
- 267.Sachdeva, P., Viridi, J.S. 2004. Repetitive elements sequence (REP/ERIC)-PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A reveal existence of limited number of clonal groups. *Fems Microbiology Letters* 240, 193-201.
- 268.Sánchez, B., Arias, S., Chaignepain, S., Denayrolles, M., Schmitter, J.M., Bressollier, P., Urdaci, M.C. 2009. Identification of surface proteins involved in the adhesion of a probiotic *Bacillus cereus* strain to mucin and fibronectin. *Microbiology* 155, 1708-1716.
- 269.Sasaki, K., Shintani, H., Itoh, J., Kamogawa, T., Kajihara, Y. 2000. Effect of calcium in assay medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 5509-5513.
- 270.Scheldeman, P., Pil, A., Herman, L., De Vos, P., Heyndrickx, M. 2005. Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1480-1494.

- 271.Schumann, P., Pukall, R. 2013. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 36, 369-375.
- 272.Schwan, R.F., Vanetti, M.C.D., Silva, D.O., Lopez, A., De Moraes, C.A. 1986. Characterization and distribution of aerobic, spore-forming bacteria from cacao fermentations in Bahia. *Journal of Food Science* 51, 1583-1584.
- 273.Schwartz, D.C., Cantor, C.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- 274.Scott, F., Threlfall, J., Stanley, J., Arnold, C. 2001. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enteritidis*: a method suitable for rapid outbreak recognition. *Clinical Microbiology and Infection* 7, 479-485.
- 275.Scott, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M.R., Flint, S.H. 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology* 60, 109-117.
- 276.Seale, R.B., Dhakal, R., Chauhan, K., Craven, H.M., Deeth, H.C., Pillidge, C.J., Powell, I.B., Turner, M.S. 2012. Genotyping of Present-Day and Historical *Geobacillus* Species Isolates from Milk Powders by High-Resolution Melt Analysis of Multiple Variable-Number Tandem-Repeat Loci. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 7090-7097.
- 277.Seale, R.B., Flint, S.H., McQuillan, A.J., Bremer, P.J. 2008. Recovery of spores from thermophilic dairy bacilli and effects of their surface characteristics on attachment to different surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 731-737.
- 278.Seifritz, C., Frostl, J.M., Drake, H.L., Daniel, S.L. 1999. Glycolate as a metabolic substrate for the acetogen *Moorella thermoacetica*. *Fems Microbiology Letters* 170, 399-405.
- 279.Sekse, C., Sunde, M., Lindstedt, B.A., Hopp, P., Bruheim, T., Cudjoe, K.S., Kvitle, B., Urdahl, A.M. 2011. Potentially human-pathogenic *Escherichia coli* O26 in Norwegian sheep flocks. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 4949-4958.
- 280.Setlow, B. 2003. Spore germination. *Current Opinion in Microbiology* 6, 550-556.
- 281.Setlow, B., Setlow, P. 1996. Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *Journal of Bacteriology* 178, 3486-3495.
- 282.Setlow, P. 1983. Germination and outgrowth. In: Hurst, A., Gould, G.W., (Eds.), *The Bacterial Spore*, vol. II, London. 211-254.
- 283.Setlow, P. 1994. Mechanisms which contribute to the long-term survival of spores of *Bacillus species*. *Society for Applied Bacteriology symposium series* 23, 49S-60S.
- 284.Setlow, P. 1995. Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus species*. *Annual Review of Microbiology* 49, 29-54.
- 285.Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101, 514-525.

286. Setlow, P. 2007. I will survive: DNA protection in bacterial spores. *Trends in Microbiology* 15, 172-180.
287. Sevenier, V., Delannoy, S., André, S., Fach, P., Remize, F. 2012. Prevalence of *Clostridium botulinum* and thermophilic heat-resistant spores in raw carrots and green beans used in French canning industry. *International Journal of Food Microbiology* 155, 263-268.
288. Severino, P., Dussurget, O., Vencio, R.Z.N., Dumas, E., Garrido, P., Padilla, G., Piveteau, P., Lemaitre, J.P., Kunst, F., Glaser, P., Buchrieser, C. 2007. Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall and stress response. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6078-6088.
289. Shangkuan, Y.H., Yang, J.F., Lin, H.C., Shaio, M.F. 2000. Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *Journal of Applied Microbiology* 89, 452-462.
290. Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Soding, J., Thompson, J.D., Higgins, D.G. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology* 7.
291. Slieman, T.A., Nicholson, W.L. 2001. Role of dipicolinic acid in survival of *Bacillus subtilis* spores exposed to artificial and solar UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1274-1279.
292. Slobodkin, A., Reysenbach, A.L., Mayer, F., Wiegel, J. 1997. Isolation and characterization of the homoacetogenic thermophilic bacterium *Moorella glycerini* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 969-974.
293. Smith, N.R., Gordon, R.E. 1957. *Bacillus*. In: Breed, R., Murray, E., Smith, N.R., (Eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed. Balliere, Tindall, Fox., London. 613-634.
294. Snelling, A.M., GernerSmidt, P., Hawkey, P.M., Heritage, J., Parnell, P., Porter, C., Bodenham, A.R., Inglis, T. 1996. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus* *Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1193-1202.
295. Snowdon, J.A., Cliver, D.O. 1996. Microorganisms in honey. *International Journal of Food Microbiology* 31, 1-26.
296. Spigaglia, P., Mastrantonio, P. 2003. Evaluation of repetitive element sequence-based PCR as a molecular typing method for *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2454-2457.
297. Spratt, B.G. 1999. Multilocus sequence typing: molecular typing of bacterial pathogens in an era of rapid DNA sequencing and the internet. *Current Opinion in Microbiology* 2, 312-316.

- 298.Spratt, B.G., Maiden, M.C. 1999. Bacterial population genetics, evolution and epidemiology. Philosophical Transaction of the Royal Society of London : B Biological Science 354, 701-710.
- 299.Stackebrandt, E., Goebel, B.M. 1994. A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. International Journal of Systematic Bacteriology 44, 846-849.
- 300.Steichen, C.T., Kearney, J.F., Turnbough, C.L. 2005. Characterization of the exosporium basal layer protein BxpB of *Bacillus anthracis*. Journal of Bacteriology 187, 5868-5876.
- 301.Stern, M.J., Ames, G.F.-L., Smith, N.H., Clare Robinson, E., Higgins, C.F. 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: A major component of the bacterial genome. Cell 37, 1015-1026.
- 302.Talabardon, M., Schwitzguebel, J.P., Peringer, P. 2000. Anaerobic thermophilic fermentation for acetic acid production from milk permeate. Journal of Biotechnology 76, 83-92.
- 303.Tauveron, G., Slomianny, C., Henry, C., Faille, C. 2006. Variability among *Bacillus cereus* strains in spore surface properties and influence on their ability to contaminate food surface equipment. International Journal of Food Microbiology 110, 254-262.
- 304.Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D., Swaminathan, B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal of Clinical Microbiology 33, 2233-2239.
- 305.Tenover, F., Vaughn, R., McDougal, L., Fosheim, G., McGowan, J. 2007. Multiple locus variable number tandem repeat assay analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. Journal of Clinical Microbiology 45, 5.
- 306.Thompson, P.J., Thames, O.A. 1967. Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. Appl Microbiol 15, 975-979.
- 307.Todd, S.J., Moir, A.J.G., Johnson, M.J., Moir, A. 2003. Genes of *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis* encoding proteins of the exosporium. Journal of Bacteriology 185, 3373-3378.
- 308.Torriani, S., Zapparoli, G., Dellaglio, F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. Applied and Environmental Microbiology 65, 4351-4356.
- 309.Tucker, G., Featherstone, S. 2011. Essentials of Thermal Processing Wiley-Blackwell, London.
- 310.Unger-Bimczok, B., Kottke, V., Hertel, C., Rauschnabel, J. 2008. The influence of humidity, hydrogen peroxide concentration, and condensation on the inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores with hydrogen peroxide vapor. Journal of Pharmaceutical Innovation 3, 123-133.

- 311.UNILET. 2012. Union Nationale Interprofessionnelle des Légumes de Conserve. Bilan économique 2012, Paris.
- 312.Ursing, J.B., Rossellomora, R.A., Garciavaldes, E., Lalucat, J. 1995. Taxonomic note - A pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 604-604.
- 313.USP. 2008. Biological indicators resistance and performance tests, The United States Pharmacopeia XXXI, vol. 31 th rev. United States Pharmacopoeia Convection, Rockville.
- 314.van Belkum, A., Scherer, S., van Alphen, L., Verbrugh, H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology Molecular Biology Reviews* 62, 275-293.
- 315.van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H., Tibayrenc, M. 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 547-560.
- 316.van den Berg, R.J., Schaap, I., Templeton, K.E., Klaassen, C.H.W., Kuijper, E.J. 2007. Typing and subtyping of *Clostridium difficile* isolates by using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 1024-1028.
- 317.Vassart, G., Georges, M., Monsieur, R., Brocas, H., Lequarre, A. 1987. A sequence in M13 phage detects hypervariable minisatellites in human and animal DNA. *Science* 235, 683-684.
- 318.Vergnaud, G., Denoeud, F. 2000. Minisatellites: Mutability and Genome Architecture. *Genome Research* 10, 899 - 907.
- 319.Versalovic, J., Lupski, J.R. 1998. Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. In: de Bruijn, F.J., Lupski, J.R., Weinstock, G.M., (Eds.), *Bacterial Genomics: Physical Structure and Analysis*. USA: Chapman & Hall, New York. 38-48.
- 320.Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 5, 25-40.
- 321.Visca, P., D'Arezzo, S., Ramisse, F., Gelfand, Y., Benson, G., Vergnaud, G., Fry, N.K., Pourcel, C. 2011. Investigation of the population structure of *Legionella pneumophila* by analysis of tandem repeat copy number and internal sequence variation. *Microbiology* 157, 2582-2594.
- 322.Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T.v.d., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23, 4407-4414.
- 323.Vreeland, R.H., Rosenzweig, W.D., Powers, D.W. 2000. Isolation of a 250 million-year-old halotolerant bacterium from a primary salt crystal. *Nature* 407, 897-900.
- 324.Wagner, I.D., Wiegel, J. 2008. Diversity of thermophilic anaerobes. *Annals of the New York Academy of Science* 1125, 1-43.

325. Waller, L.N., Fox, N., Fox, K.F., Fox, A., Price, R.L. 2004. Ruthenium red staining for ultrastructural visualization of a glycoprotein layer surrounding the spore of *Bacillus anthracis* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbiological Methods* 58, 23-30.
326. Warth, A.D. 1978. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *J Bacteriol* 134, 699-705.
327. Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18, 7213-7218.
328. Weng, F.Y., Chiou, C.S., Lin, P.H.P., Yang, S.S. 2009. Application of *recA* and *rpoB* sequence analysis on phylogeny and molecular identification of *Geobacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* 107, 452-464.
329. Wenjun, L.I., Mouffok, N., Rovey, C., Parola, P., Raoult, D. 2009. Genotyping *Rickettsia conorii* detected in patients with Mediterranean spotted fever in Algeria using multispacer typing (MST). *Clinical Microbiology and Infection* 15, 281-283.
330. White, D., Sharp, R.J., Priest, F.G. 1993. A polyphasic taxonomic study of thermophilic bacilli from a wide geographical area. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 64, 357-386.
331. Wiegel, J., Braun, M., Gottschalk, G. 1981. *Clostridium thermoautotrophicum* species novum, a thermophile producing acetate from molecular hydrogen and carbon dioxide. *Current Microbiology* 5, 255-260.
332. Wiegel, J., Carreira, R., Garrison, N., Rabek, N., Ljungdahl, L.G. 1991. Calcium magnesium acetate (CMA) manufacture from glucose by fermentation with thermophilic homoacetogenic bacteria. In: Wise, Levendis, Metghalchi, (Eds.), *Calcium Magnesium Acetate*. Elsevier Science, Amsterdam and New York. pp. 359-418.
333. Williams, G., Linley, E., Nicholas, R., Baillie, L. 2013a. The role of the exosporium in the environmental distribution of anthrax. *Journal of Applied Microbiology* 114, 396-403.
334. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.
335. Williams, M.L., Pearl, D.L., Bishop, K.E., LeJeune, J.T. 2013b. Use of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis to evaluate *Escherichia coli* O157 subtype distribution and transmission dynamics following natural exposure on a closed beef feedlot facility. *Foodborne Pathogens and Disease* 10, 827-834.
336. Woods, C.R., Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski, J.R. 1993. Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 1927-1931.
337. Wright, A.M., Hoxey, E.V., Soper, C.J., Davies, D.J.G. 1995. Biological indicators for low-temperature steam and formaldehyde sterilization - the effect of defined media on sporulation, growth index and formaldehyde resistance of spores of *Bacillus stearothermophilus* strains. *Journal of Applied Bacteriology* 79, 432-438.



338. Wu, L., Welker, N.E. 1991. Temperature-induced protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* NUB36. *J Bacteriol* 173, 4889-4892.
339. Xu, D., Côté, J.-C. 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 695-704.
340. Yanagihara, M., Tsuneoka, H., Sugasaki, M., Nojima, J., Ichihara, K. 2010. Multispacer typing of *Bartonella henselae* isolates from humans and cats, Japan. *Emerging Infectious Diseases* 16, 1983-1985.
341. Yang, M.J., Shao, S., Xiao, J.F., Wang, Q.Y., Zhang, Y.X. 2013. Phylogenetic investigation of *Edwardsiella tarda* with multilocus sequence typing (MLST) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) typing methods. *Aquaculture* 410, 79-85.
342. Yeo, M., Mauricio, I.L., Messenger, L.A., Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Acosta, N., Bhattacharyya, T., Diosque, P., Carrasco, H.J., Miles, M.A. 2011. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *Plos Neglected Tropical Diseases* 5.
343. Zeigler, D.R. 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1893-1900.
344. Zeigler, D.R. 2005. Application of a *recN* sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1171-1179.
345. Zeigler, D.R. 2014. The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet? *Microbiology* 160, 1-11.
346. Zhao, S., Mitchell, S.E., Meng, J., Kresovich, S., Doyle, M.P., Dean, R.E., Casa, A.M., Weller, J.W. 2000. Genomic typing of *Escherichia coli* O157:H7 by semi-automated fluorescent AFLP analysis. *Microbes and Infection* 2, 107-113.
347. Zhu, Y., Fournier, P.E., Ogata, H., Raoult, D. 2005. Multispacer typing of *Rickettsia prowazekii* enabling epidemiological studies of epidemic typhus. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4708-4712.
348. Zuber, F., Biton, M., Cazier, A. 2008. Bases scientifiques pour la maîtrise des produits appertisés, *Techniques de l'Ingénieur*.

## Valorisation du travail de thèse

### Communications scientifiques

Durand L. (2012) « **Diversité génétique de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* et *Geobacillus stearothermophilus* révélée par typage M13-PCR** » (Poster). Journées de l'école doctorale SP-SA, Montpellier II.


Durand L., Planchon S., Guinebretière M.H., André S., Carlin F., Remize F. (2012) « **Genomic heterogeneity in *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica* and *Geobacillus stearothermophilus* as revealed by M13-PCR typing** ». (Communication orale). 23rd International ICFMH Symposium, FoodMicro2012, Istanbul.

Durand L. (2013) « **Caractérisation de la diversité génétique de *Moorella* et *Geobacillus* par M13-PCR** » (Communication orale). Journées de l'école doctorale SP-SA, Montpellier II.

Durand L., Planchon S., Guinebretière M.H., André S., Carlin F., Remize F. (2013) « **Caractérisation de la diversité génétique de *Moorella* et *Geobacillus* par M13-PCR** » (Poster). 9<sup>ème</sup> congrès national de la Société Française de Microbiologie, Lille, 7 et 8 février.

Durand L., Guinebretière M.H., Carlin F., André S., Remize F., Planchon S. (2013) “**Genetic and phenotypic diversity of two highly thermoresistant species responsible for Low Acid Canned Foods spoilage**” (Communication orale). Microbial Spoilers in Food 2013, Quimper, 1, 2 et 3 juillet.

Durand L. (2012) « Diversité génétique de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* et *Geobacillus stearothermophilus* révélée par typage M13-PCR » (Poster). Journées de l'école doctorale SP-SA, Montpellier II.



## Diversité génétique de *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* et *Geobacillus stearothermophilus* révélée par typage M13-PCR

**Loïc DURAND<sup>1</sup>, Stella PLANCHON<sup>1</sup>, Marie-Hélène GUINEBRETIERE<sup>2</sup>, Fabienne REMIZE<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> CTCPA UMT QUALIVEG Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles, Site Agroparc, - BP21203, 84911 Avignon Cedex 9, France  
Tel : +33 (0)4 90 84 17 09 - Fax : +33 (0)4 90 84 17 26 Idurand@ctcpa.org

<sup>2</sup> UMR408 INRA - UAPV, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 9, France  
Tel : +33 (0)4 32 72 25 19 guinebre@avignon.inra.fr

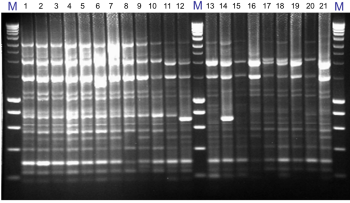
<sup>3</sup> Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments, Université de la Réunion, Parc Technologique Universitaire, 97490 Sainte Clotilde, France. Tel : +33 (0)2 62 48 33 43 fabienne.remize@univ-reunion.fr

Dans le cadre du contrôle qualité réalisé par les industries, une incubation des produits peu acides pendant 7 jours à 37°C et à 55°C est réalisée afin de détecter des modifications du produit d'origine microbienne. Le test de stabilité à 55°C permet de mettre en évidence la présence de bactéries thermophiles d'altérations, non pathogène pour l'homme, qui auraient résisté sous forme de spores à la stérilisation. Les bactéries thermophiles sont reconnues comme la cause majeure des non-stabilités des conserves. Le duo constitué de l'anaérobie *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* et l'aérobie *Geobacillus stearothermophilus* représente plus de 75% des cas de non-stabilité à 55°C. Afin d'estimer la variabilité génétique des populations isolées de conserverie, la méthode de typage M13-PCR a été développée sur les isolats de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* et *G. stearothermophilus* issus des non-stabilité à 55°C. L'objectif de cette étude était de typer les 250 isolats de la souchothèque du CTCPA par la méthode M13-PCR afin de déterminer des groupes génétiques pour les études physiologiques subséquentes.

**Matériels et Méthodes**

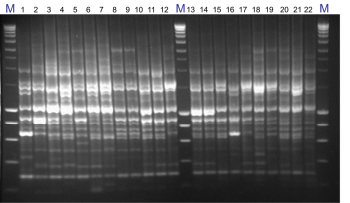
Les isolats de *Geobacillus* et *Moorella* sont cultivés dans leur milieu de culture respectif puis étalés sur boîtes gélosées afin d'obtenir des cultures jeunes. L'ADN est ensuite extrait à partir d'un protocole d'extraction au phénol/chloroforme. 25 ng d'ADN est utilisé pour chaque réaction PCR utilisant l'amorce M13. Les produits d'amplification sont déposés sur un gel d'agarose à 1,5% et sont analysés à l'aide du logiciel BioGene 99.04.

*Geobacillus*



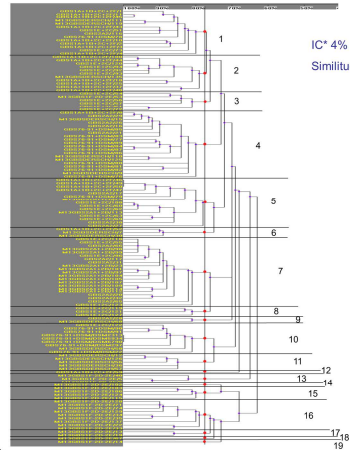
**Typage moléculaire avec la méthode M13-PCR**

*Moorella*



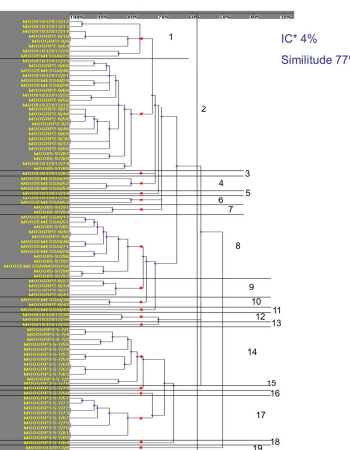
135 et 97 souches de *Geobacillus* et *Moorella* respectivement ont été typées à l'aide de cette méthode dans le but de définir des groupes génétiques. Cela nous permettra de mettre en évidence l'existence de liens intra-espèces afin d'établir des relations entre les différentes souches contaminantes telles que la nature du produit, l'entreprise ou la localisation géographique.

**Dendrogramme *Geobacillus***



IC\* 4%  
Similitude 77%

**Dendrogramme *Moorella***



IC\* 4%  
Similitude 77%

19 groupes ont été obtenus pour chacune des espèces étudiées. Un représentant de chaque groupe sera choisi afin de déterminer les caractères phénotypiques (pH, T°...) propres à chaque communauté.

\* IC = Intervalle de Confiance



Durand L., Planchon S., Guinebretière M.H., André S., Carlin F., Remize F. (2012)  
« **Genomic heterogeneity in *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica* and  
*Geobacillus stearothermophilus* as revealed by M13-PCR typing** ».

(Communication orale). 23rd International ICFMH Symposium, FoodMicro2012, Istanbul.

**Genomic heterogeneity in *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica* and  
*Geobacillus stearothermophilus* as revealed by M13-PCR typing**

Loïc DURAND<sup>1</sup>, Stella PLANCHON<sup>2</sup>, Marie-Hélène GUINEBRETIERE<sup>3</sup>,  
Stéphane ANDRE<sup>2</sup>, Frédéric CARLIN<sup>3</sup>, Fabienne REMIZE<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CTCPA – INRA, CTCPA - Site Agroparc - ZA de l'Aéroport, BP 21203 - 84911 AVIGNON  
cedex 9, France

<sup>2</sup>UMTQualiveg, CTCPA, Avignon, France

<sup>3</sup>UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, France

<sup>4</sup>LCSNSA, Université de La Réunion, Sainte Clotilde, France

Two thermophilic bacteria, the anaerobe *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica* and the aerobic *Geobacillus stearothermophilus*, are responsible for 75% of canned food spoilage in stability test controls. Both species form Highly Heat Resistant Spores (HHRS) which can withstand the sterilization process. These bacteria are largely present in the environment and consequently contaminate vegetable processing lines.

Very few studies investigated the variability of physiological properties within the two species *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* and none the genomic variability. This information is necessary better understand the ecology of these species and define strategy for control in canned foods We aimed to evaluate intra-species diversity by typing isolates of these two thermophilic species.

A M13-PCR based method was chosen and applied for typing the two species. A total of 140 and 94 isolates of *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica*, respectively, collected from canned foods non microbiologically stable at 55°C over a period of ten years and 5 references strains, were submitted to typing analysis. Isolates were classified in different groups according to their electrophoretic profiles obtained after amplification of the M13 bacteriophage sequence and analysis with the Biogene software (Bio Profil,V99.04).

Our results showed an important intraspecies diversity with this method. 19 groups were obtained for each of the species *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica*. In the selected conditions *i.e.* with a confidence interval of 4% and a similarity value of 77%, 87% of *G. stearothermophilus* isolates and 78% of *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* isolates belonged respectively to 10 and 6 main groups. In each group and between groups, no correlation can be done between strains and the nature of food product or the canned food manufacture or the year of isolation. The phenotypes of isolates that belong to different genetic groups will be further characterized in order to estimate the variability range of several key properties (growth temperature and pH, sporulation and germination abilities and spore resistance).

Durand L., Planchon S., Guinebretière M.H., André S., Carlin F., Remize F. (2013)  
« **Caractérisation de la diversité génétique de *Moorella* et *Geobacillus* par M13-PCR** »  
(Poster). 9<sup>ème</sup> congrès national de la Société Française de Microbiologie, Lille, 7 et 8 février.

### **Caractérisation de la diversité génétique de *Moorella* et *Geobacillus* par M13-PCR**

Loïc DURAND<sup>1</sup>, Stella PLANCHON<sup>2</sup>, Marie-Hélène GUINEBRETIÈRE<sup>3</sup>,  
Stéphane ANDRE<sup>2</sup>, Frédéric CARLIN<sup>3</sup>, Fabienne REMIZE<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CTCPA – INRA, CTCPA - Site Agroparc - ZA de l'Aéroport, BP 21203 - 84911 AVIGNON  
cedex 9, France

<sup>2</sup>UMTQualiveg, CTCPA, Avignon, France

<sup>3</sup>UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, France

<sup>4</sup>LCSNSA, Université de La Réunion, Sainte Clotilde, France

*Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* et *Geobacillus stearothermophilus* sont deux bactéries thermophiles formant des spores. Ces deux espèces sont responsables de 75% des altérations de conserves après incubation prolongée à 55°C (NF V08-401). Les spores hautement thermorésistantes qu'elles forment peuvent notamment résister au processus d'appertisation. Elles sont très largement retrouvées dans l'environnement et par conséquent contaminent les lignes de transformation de légumes.

Compte tenu de leur caractère non pathogène, peu d'études ont été menées sur la variabilité génétique et phénotypique au sein de chaque espèce. Ces informations sont nécessaires pour mieux comprendre leur écologie et ainsi définir une stratégie adéquate pour assurer la stabilité des conserves.

Ce travail avait pour objectif de déterminer la diversité intra-espèces par typage moléculaire. La méthode de M13-PCR a été choisie et appliquée pour le typage des deux espèces. Un total de 130 et 88 isolats de *G. stearothermophilus* et *M. thermoacetica/thermoautotrophica* respectivement a été utilisé. Ces isolats proviennent de conserves non stables à 55°C analysées sur une période de 10 ans. Cinq souches de collection (DSMZ) ont été rajoutées à l'étude. L'ensemble des isolats a été classé en fonction du profil électrophorétique, obtenu après amplification de la séquence du coliphage M13 et analyse du profil avec le logiciel BioGene (Bio Profil, V99.04).

Nos résultats ont montré une importante diversité intra-espèce avec cette méthode. Pour chacune des deux espèces, 19 groupes ont été obtenus en prenant un seuil de similarité à 77% et un intervalle de confiance à 4%. Dans ces conditions, 87% des isolats de *G. stearothermophilus* et 84% des isolats de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* appartenaient respectivement à 10 et 7 groupes majoritaires. Au sein de chaque groupe et entre les groupes, aucune corrélation n'a pu être établie entre les souches et la nature du produit alimentaire, le lieu de fabrication de la conserve ou encore l'année d'isolement. Le phénotypage d'un isolat de chaque groupe génétique est en cours dans le but d'estimer la variabilité de propriétés physiologiques comme la température et le pH de croissance, la sporulation et les propriétés des spores (thermorésistance et germination).

**Mots clés :** *G. stearothermophilus*, *M. thermoacetica/thermoautotrophica*, conserves, M13 PCR, diversité

Loïc DURAND<sup>1</sup>, Stella PLANCHON<sup>2</sup>, Marie-Hélène GUINEBRETIÈRE<sup>3</sup>, Stéphane ANDRE<sup>2</sup>, Frédéric CARLIN<sup>3</sup>, Fabienne REMIZE<sup>4</sup>

<sup>1</sup>CTCPA, Site Agroparc, ZA de l'aéroport - BP21203, 84911 Avignon Cedex 9, France ldurand@ctcpa.org

<sup>2</sup>UMTQualiveg, CTCPA, Avignon, France

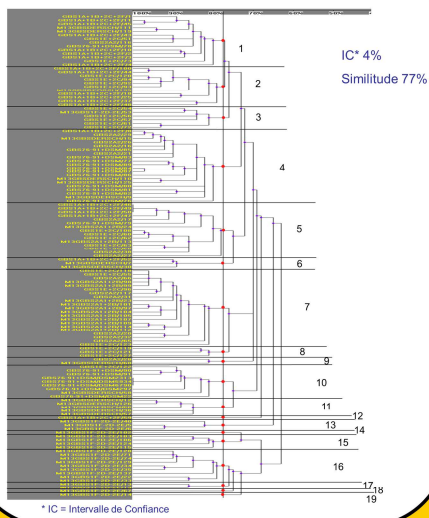
<sup>3</sup>UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, INRA, France

<sup>4</sup>LCSNSA, Université de La Réunion, Sainte Clotilde, France

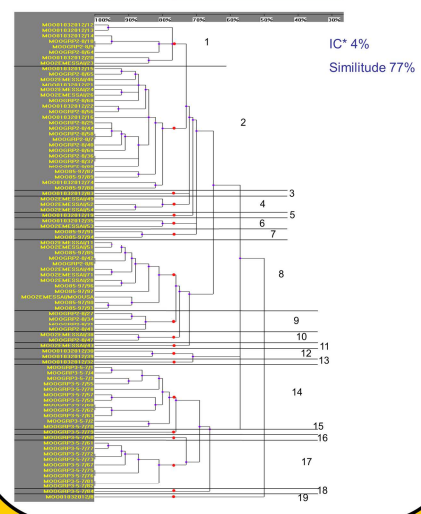
Les bactéries thermophiles sont reconnues comme la cause majeure des non-stabilités des conserves. Le duo constitué du germe anaérobie strict *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* et du germe aéro-anaérobie facultatif *Geobacillus stearothermophilus* représente plus de 67% des cas de non-stabilité à 55°C. Afin d'estimer la variabilité génétique des populations isolées de conserverie, la méthode de typage M13-PCR a été adaptée avec les isolats de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* et *G. stearothermophilus* issus des non-stabilité à 55°C.

Le typage des 250 isolats de la collection du CTCPA et la détermination des groupes génétiques avaient pour objectif de choisir des souches en vue de la caractérisation de la diversité physiologique au sein des deux espèces.

Dendrogramme *Geobacillus*

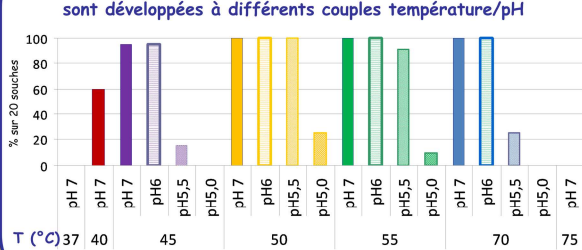


Dendrogramme *Moorella*

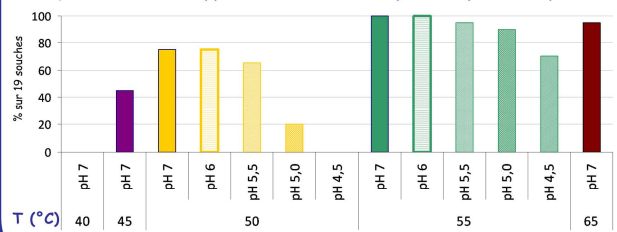


19 groupes reproductibles ont été obtenus pour chacune des espèces étudiées. Un représentant de chaque groupe a été sélectionné afin d'étudier la diversité phénotypique de chaque espèce

Pourcentage de souches de *G. stearothermophilus* qui se sont développées à différents couples température/pH



Pourcentage de souches de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* qui se sont développées à différents couples température/pH



Cette étude s'est focalisée sur la caractérisation phénotypique de souches de *G. stearothermophilus* et *M. thermoacetica/thermoautotrophica* choisies par analyse de la diversité génétique des isolats de la collection du CTCPA à l'aide de la méthode de typage moléculaire M13-PCR. Les résultats montrent une homogénéité des conditions de croissance des souches excepté à pH 5 pour *G. stearothermophilus* et à 50°C pour *M. thermoacetica/thermoautotrophica*. D'autres caractères phénotypiques sont étudiés (T°C, pH, croissance en présence de NaCl, sporulation et résistance thermique des spores) afin de confirmer la faible diversité phénotypique parmi les souches ayant résisté aux barèmes d'appertisation.

Durand L. (2013) « **Caractérisation de la diversité génétique de *Moorella* et *Geobacillus* par M13-PCR** » (Communication orale). Journées de l'école doctorale SP-SA, Montpellier II.

### **Caractérisation de la diversité génétique de *Moorella* et *Geobacillus* par M13-PCR**

Loïc Durand<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CTCPA – INRA, CTCPA - Site Agroparc - ZA de l'Aéroport, BP 21203 - 84911 AVIGNON cedex 9, France

*Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* et *Geobacillus stearothermophilus* sont deux bactéries thermophiles formant des spores. Ces deux espèces sont responsables de 75% des altérations de conserves après incubation prolongée à 55°C (NF V08-401). Les spores hautement thermorésistantes qu'elles forment peuvent notamment résister au processus d'appertisation. Elles sont très largement retrouvées dans l'environnement et par conséquent contaminent les lignes de transformation de légumes.

Compte tenu de leur caractère non pathogène, peu d'études ont été menées sur la variabilité génétique et phénotypique au sein de chaque espèce. Ces informations sont nécessaires pour mieux comprendre leur écologie et ainsi définir une stratégie adéquate pour assurer la stabilité des conserves.

Ce travail avait pour objectif de déterminer la diversité intra-espèces par typage moléculaire. La méthode de M13-PCR a été choisie et appliquée pour le typage des deux espèces. Un total de 131 et 88 isolats de *G. stearothermophilus* et *M. thermoacetica/thermoautotrophica* respectivement a été utilisé. Ces isolats proviennent de conserves non stables à 55°C analysées sur une période de 10 ans. Cinq souches de collection (DSMZ) ont été rajoutées à l'étude. L'ensemble des isolats a été classé en fonction du profil électrophorétique, obtenu après amplification de la séquence du coliphage M13 et analyse du profil avec le logiciel BioGene (Bio Profil, V99.04).

Nos résultats ont montré une importante diversité intra-espèce avec cette méthode. Pour chacune des deux espèces, 19 groupes ont été obtenus en prenant un seuil de similarité à 77% et un intervalle de confiance à 4%. Dans ces conditions, 87% des isolats de *G. stearothermophilus* et 84% des isolats de *M. thermoacetica/thermoautotrophica* appartenaient respectivement à 10 et 7 groupes majoritaires. Au sein de chaque groupe et entre les groupes, aucune corrélation n'a pu être établie entre les souches et la nature du produit alimentaire, le lieu de fabrication de la conserve ou encore l'année d'isolement. Le phénotypage d'un isolat de chaque groupe génétique de *G. stearothermophilus* a été réalisé dans le but d'estimer la variabilité de propriétés physiologiques comme la température et le pH de croissance, la sporulation et les propriétés des spores (thermorésistance et germination).

Mots clés: *G. stearothermophilus*, *M. thermoacetica/thermoautotrophica*, conserves, M13 PCR, diversité

Durand L., Guinebretière M.H., Carlin F., André S., Remize F., Planchon S. (2013) “**Genetic and phenotypic diversity of two highly thermoresistant species responsible for Low Acid Canned Foods spoilage**” (Communication orale). Microbial Spoilers in Food 2013, Quimper, 1, 2 et 3 juillet.

### **Genetic and phenotypic diversity of two highly thermoresistant species responsible for Low Acid Canned Foods spoilage**

Loïc DURAND<sup>1</sup>, Marie Hélène GUINEBRETIERE<sup>2</sup>, Frédéric CARLIN<sup>2</sup>, Stéphane ANDRÉ<sup>1</sup>, Fabienne REMIZE<sup>3</sup> and Stella PLANCHON<sup>1</sup>

<sup>1</sup>CTCPA - UMT Qualiveg, Unité de Microbiologie, ZA de l'aéroport, Avignon, France

<sup>2</sup>INRA - UMT Qualiveg, UMR408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, Avignon, France

<sup>3</sup>LCSNSA, Université de La Réunion, Sainte Clotilde, France

**Introduction:** Two thermophilic bacteria, the anaerobe *Moorella thermoacetica* and the aerobic *Geobacillus stearothermophilus*, are responsible for 75% of low acid canned foods spoilage at high incubation temperatures (55°C). These bacteria are largely present in the environment and consequently contaminate vegetable and prepared meals processing lines. Both species form Highly Heat Resistant Spores (HHRS) which can withstand the sterilization process. Few studies concerning genetic diversity are available on these species. Improved knowledge of these species concerning genetic and physiologic properties, will lead us to a better understanding of their ecology and a more accurate strategy for control them in canned foods.

**Material and methods:** A total of 140 *G. stearothermophilus* and 94 *M. thermoacetica* isolates, collected from spoiled canned foods after incubation at 55°C, over a period of ten years, were used in this study. Reference strains (5 DSMZ and 1 ATCC) were added. A M13-PCR based method was selected and applied to type isolates for each species. Different groups were obtained by electrophoretic profiles analysis with the Biogene software (Bio Profil V99.04). The phenotypes of selected isolates (one per group) will be further characterized for growth and sporulation temperature and pH, and spore heat resistance.

**Results:** Nineteen groups were obtained for each of the species *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* in the selected conditions. 87% of *G. stearothermophilus* isolates and 78% of *M. thermoacetica* isolates belonged to 10 and 6 main groups, respectively. In each group and between groups, no correlation was found between strains and the nature of food product or the canneries involved or the year of isolation. Physiological studies were performed on 20 isolates for each species. Minimal and maximal growth temperatures were 40°C and 70°C for *G. stearothermophilus* and 45°C and 65°C for *M. thermoacetica*. Growth at different pH showed an acido-tolerant character for *M. thermoacetica* with 50% of isolates growing at pH 4.5 while no growth was obtained for *G. stearothermophilus* under pH 5.0. Sporulation efficiency (measured by microscopic observation) was very poor during 3 weeks in extremes conditions, except for one strain. Sporulation study is still running for *M. thermoacetica*. Low differences were obtained in heat resistance of spores produced in optimal conditions for the 20 isolates of *G. stearothermophilus* (0.2 min ≤ D 120°C ≤ 2 min).

**Significance:** An important intraspecies diversity was shown for both species and further work seems necessary to establish a correlation between isolates present in canned foods before heat treatment and the ones responsible for canned foods spoilage. Data about growth and sporulation will allow us to give best recommendations concerning critical control points relevant for a vegetable processing line.

**Keywords:** genetic diversity, growth, temperature, pH, sporulation, heat resistance



**Abstract**

Canned food spoilage is mainly caused by an increase of heat-resistant spore population prior to sterilization and an increase of their heat resistance. Thermophilic bacteria *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* and *Geobacillus stearothermophilus* are involved in more than 70% of canned food spoilage cases at 55°C. Clearly, spoilage risk control required an increased knowledge of physiological characteristics, variability of intra-species characteristics and conditions for highly-heat resistant spore formation within both species.

The first aim of this PhD work was to evaluate the genetic and phenotypic diversity of collection isolates from canned food spoilage. The M13-PCR typing method showed a low genetic diversity among *Geobacillus stearothermophilus* isolates. Data obtained were supported by complementary approaches on a sub-group of strains by *panC* gene sequencing and REP-PCR analysis. The ability of isolates to grow at pH comprised between 5.0 and 6.5, at temperature of 40°C to 70°C and at NaCl concentrations of 1% to 5%, plus the spore formation conditions were in accordance with previous reported results. These abilities poorly differed among tested isolates. On the opposite, heat-resistance exhibited a marked strain-effect: the time required to inactivate 10<sup>5</sup> spores at 120°C varied between <0.5 min to 12.1 min depending on the isolate. Remarkably, strains that exhibited the highest heat resistance were also able to grow at the lowest temperature and at a NaCl concentration of 3%. Investigation by multiple component analysis of a possible relationship between genetic group and isolate origin, as defined from isolation geographic area, date of isolation and food category, and physiological characteristics was negative. The same approach was used for *M. thermoacetica/autotrophica* isolates, but MLVA (Multiple Locus VNTR Analysis) was additionally developed based on genomic sequence available. Respectively, 21 and 30 profile-types were defined from M13-PCR and MLVA analyses. MLVA resulted in genetic groups of homogeneity size. As for *G. stearothermophilus*, genetic groups were not related to strain origin, except for one MLVA group that gathered strains from the same cannery. Growth temperatures, 45°C to 68°C, and pH, 4.5 to 7, suggested that isolates were closer to *M. autotrophica* than to *M. thermoacetica*. The time required for inactivation of 10<sup>5</sup> spores at 130°C varied between 7 min to 15 min for most of strains, but between 19 and 28.5 min for the three most heat-resistant ones.

In parallel, the ecology of a single processing chain used for canned green pea and carrot transformation in Bretagne was explored in order to determine spore flux contamination between raw materials and transformed food just before heat-treatment. From two successive production campaigns, 341 samples were collected and used for thermophilic spore enumeration and specific detection of the three species the most frequently involved in high temperature canned food spoilage. M13-PCR typing was applied on 112 isolates from these samples. Taken together, the results showed that the main contamination pathway was related to soil spores, via raw vegetables, and that vegetable preparation, by washing, cutting and/or peeling, was efficient to significantly decrease spore level. Two areas from the processing chain were pointed as critical. The blanching step resulted in a decrease in spore levels, but resulted in a cross-contamination of vegetables passing through the machine and to a selection of highly-heat resistant spores. Out-of-flow vegetables that accumulated during transfers resulted in punctual increases of spore population in the transformed product before heat-treatment. The results of this Ph.D work are used to propose practices for canneries that aim to limit spoilage risk of canned food.

---

**Keywords:** Ecology, Spores, Thermophilic bacteria, Canned food, *Geobacillus*, *Moorella*

---

**Résumé**

La non-stabilité des aliments en conserve est due à l'augmentation de la population de spores avant traitement thermique et à l'augmentation de leur thermorésistance. Les bactéries thermophiles que sont *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica* et *Geobacillus stearothermophilus* causent plus de 70% des cas de non-stabilité des conserves à 55°C. La maîtrise du risque butait clairement sur le manque de connaissance de ces bactéries, tant au plan physiologique, que sur la variabilité des propriétés au sein des espèces et des conditions de formation de spores hautement thermorésistantes.

L'objectif de ce travail de thèse était d'abord d'évaluer la diversité génétique et phénotypique d'isolats issus de cas de non-stabilité. La méthode de typage M13-PCR a montré une faible diversité génétique entre les isolats de *G. stearothermophilus*. Ces données sont renforcées, pour un sous-groupe de souches, par le résultat du séquençage du gène *panC* et l'application de la méthode de REP-PCR. La capacité des isolats à se développer selon le pH (5,0 à 6,5), la température (40°C à 70°C) et la concentration en chlorure de sodium (1% à 5%), ainsi que les conditions de formation des spores, sont en accord avec les descriptions antérieures et diffèrent peu entre les souches. La résistance thermique des spores montre par contre un effet souche marqué : la durée nécessaire pour inactiver  $10^5$  spores à 120°C varie entre <0,5 min et 12,1 min. De façon remarquable, les souches dont les spores sont les plus résistantes ont aussi celles qui se développent à la température la plus basse et à la concentration en sel de 3%. Aucune relation entre le groupe génétique et l'origine, géographique, temporelle ou liée aux caractéristiques de l'aliment, ni même entre le groupe génétique et les caractéristiques physiologiques, n'a pu être établie par analyse des correspondances multiples. La même approche a été appliquée pour caractériser *M. thermoacetica*. De plus, la MLVA (Multi Locus VNTR Analysis) a été développée pour cette espèce. Un total de 21 et 30 profil-types ont été respectivement obtenus avec la M13-PCR et la MLVA, cette dernière conduisant à des groupes génétiques de taille plus homogène. Les groupes génétiques ne sont pas corrélés à l'origine des souches, excepté pour un groupe obtenu par MLVA dont les isolats proviennent de la même usine. Les conditions de température (45°C à 68°C) et de pH (4,5 à 7) permettant la croissance laissent penser que les souches sont plus proches de l'espèce *M. autotrophica* que de *M. thermoacetica*. La durée nécessaire pour inactiver  $10^5$  spores à 130°C varie de 7 à 15 min pour la majorité des souches, mais entre 19 et 28,5 min pour les trois les plus résistantes.

En parallèle, l'écologie d'une ligne de fabrication de conserves de légumes a été explorée afin de déterminer les flux de contamination en spores des matières premières jusqu'au produit avant traitement thermique. Au cours de deux campagnes successives de production, 341 échantillons ont été prélevés sur une unique ligne de transformation en Bretagne. Le dénombrement des spores de bactéries thermophiles et la détection spécifique des trois espèces thermophiles les plus fréquentes ont été appliquées. La méthode de typage M13-PCR a été appliquée sur 112 isolats de *G. stearothermophilus*. Les résultats ont permis de confirmer que la contamination majoritaire provient du sol, via les légumes, et que la préparation des légumes contribue significativement à diminuer le nombre de spores. Deux zones sur la ligne de transformation apparaissent comme cruciales. Le blancheur permet de diminuer le niveau de spores mais conduit à la contamination croisée des légumes et à une sélection des spores les plus thermorésistantes. Les débris hors du flux de transformation conduisent à des augmentations ponctuelles du nombre de spores dans les produits en fin de transformation. L'ensemble des résultats permet de proposer des pratiques pour limiter le risque de non-stabilité des conserves.

---

**Discipline** : Biologie des organismes

**Mots clés** : Ecologie, Spores, Bactéries thermophiles, Conserves alimentaires, *Geobacillus*, *Moorella*

