



**HAL**  
open science

# Caractérisation et écologie microbienne de lignes de production de conserves

Stéphane André

► **To cite this version:**

Stéphane André. Caractérisation et écologie microbienne de lignes de production de conserves. Biotechnologies. Université Montpellier, 2015. Français. NNT : 2015MONTTS047 . tel-01545918

**HAL Id: tel-01545918**

**<https://theses.hal.science/tel-01545918>**

Submitted on 23 Jun 2017

**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 l'Université Montpellier

Préparée au sein de l'école doctorale  
Sciences des Procédés - Sciences des Aliments  
et de l'unité de recherche IATE

Spécialité : Biotechnologie, Microbiologie

**Présentée par Stéphane ANDRE**

Unité de microbiologie EMaiRIT'S

**ct @ pa**

## **Caractérisation et écologie microbienne de lignes de production de conserves**

**Soutenue le 16 juin 2015 devant le jury composé de**

Mme Monique ZAGOREC, Directeur de recherche, INRA	Rapporteur
M. Ivan LEGUERINEL, Professeur, UBO	Rapporteur
Mme Eliane DUMAY, Professeur, UM	Examineur
M. Eric SPINNLER, Professeur, Agro Paris Tech	Examineur
Mme Tatiana VALLAEYS, Professeur, UM	Co-directrice
M. Charles GHOMMIDH, Professeur, UM	Directeur





## REMERCIEMENTS

---

Je tiens à remercier en premier lieu tous mes collaborateurs, passés et présents, qui m'ont permis de m'épanouir en tant que chef de projet au CTCPA ainsi que d'acquérir les données présentées dans ce document.

Je pense tout d'abord à mes collègues amiénois comme Dung, Didier ou Armelle mais aussi l'équipe de techniciens avec qui j'ai acquis mes premières expériences en microbiologie des aliments : Caroline, Nathalie, Nina, Olivier et bien sûr Benoit, descendu en même temps que moi dans le grand Sud et qui est aujourd'hui la mémoire technique du labo.

A cette équipe, il faut ajouter la relève avignonnaise avec qui j'ai reconstruis une équipe dynamique et performante avec, par ordre d'ancienneté, Eddy le multitâche, Barbara la maman de tous et la petite nouvelle, Sandra. A cette fine équipe, j'associe Fabienne avec qui nous avons placé le labo sur une toute nouvelle orbite scientifique, notamment avec les premiers articles internationaux publiés par l'unité. Et je finirai bien sûr avec Stella, avec qui toute discussion est possible pour améliorer sans cesse la qualité de nos projets. Enfin, je ne peux oublier notre cher docteur Zuber et nos discussions, de temps en temps enflammées, aussi bien au niveau scientifique que budgétaire. Et je ne pourrai terminer ces remerciements au personnel du CTCPA sans parler de l'équipe dirigeante qui m'a soutenu dans ce projet.

Enfin, j'aimerais associer tous les stagiaires qui sont venus travailler quelques temps avec nous ainsi que les 2 doctorants avec qui j'ai pu interagir étroitement ces dernières années : Clémence dans le cadre de la première participation de l'unité à un projet ANR et Loïc, qui restera à jamais le premier doctorant en microbiologie du CTCPA.

Ce manuscrit, qui est le résumé des travaux effectués ces 12 dernières années au sein du CTCPA, est surtout le travail de plus de 18 mois de rédaction où il m'a fallu me replacer dans le rôle d'un « apprenant » vis-à-vis de ma « co-directrice » de thèse qu'a été Tatiana. Nos discussions m'ont été enrichissantes et formatrices tout particulièrement pour mettre en forme ce manuscrit et sortir de mon carcan trop rigide. Côtayer un caractère si différent du mien m'a été, et me sera, toujours profitable notamment pour exploiter au maximum chaque information ou chaque résultat mais aussi acquérir un esprit plus académique nécessaire à tout bon docteur. Et je ne peux oublier M. Ghommidh sans qui cette thèse aurait été beaucoup plus compliquée à finaliser, dans tous les sens du terme.

Pour finir, je dédie cette thèse à mes 3 garçons, même s'ils dormaient profondément lorsque je travaillais sur ce projet, et à ma femme, Pascale, avec qui j'ai pris la décision de m'engager dans cette voie, et qui, surtout, m'a toujours soutenu et su m'encourager lorsqu'il fallait remettre le pied à l'étrier dans certains moments de plus faible motivation.

# SOMMAIRE

---

<b>1 - AVANT PROPOS</b>	<b>1</b>
<b>1.1. PROJET PERSONNEL</b>	<b>2</b>
<b>1.2. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES</b>	<b>2</b>
1.2.1. ARTICLES	2
1.2.2. PRESENTATIONS ORALES	3
<b>1.3. LE CTCPA ET LA MICROBIOLOGIE</b>	<b>4</b>
<b>2 - INTRODUCTION</b>	<b>6</b>
<b>2.1. MODES DE PRESERVATION DES ALIMENTS</b>	<b>7</b>
<b>2.2. L'APPERTISATION</b>	<b>9</b>
<b>3 - BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>13</b>
<b>3.1. CAS PARTICULIER DES FLORES D'ALTERATION SPORULANTES EN AGRO-ALIMENTAIRE</b>	<b>14</b>
<b>3.2. UNE DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES COMMUNE A TOUS LES GERMES SPORULANTS : LA THERMORESISTANCE</b>	<b>15</b>
3.2.1. LA SPORE : FORME DE RESISTANCE	15
3.2.2. ORIGINE DES SPORES	16
3.2.3. MODELISATION DE LA THERMORESISTANCE	18
<b>3.3. POSITIONNEMENT PHYLOGENIQUE DES FLORES D'ALTERATION SPORULANTES EN AGRO-ALIMENTAIRE</b>	<b>20</b>
<b>3.4. LES OUTILS DE BIOLOGIE MOLECULAIRE AU SERVICE DE L'ECOLOGIE MICROBIENNE</b>	<b>23</b>
3.4.1. ANALYSE DE L'ADN TOTAL	24
3.4.2. ANALYSE DE PROFILS ISSUE DE LA PCR	25
3.4.3. LES TECHNIQUES DE SEQUENÇAGE	28
3.4.4. LES TECHNIQUES D'HYBRIDATION DE L'ADN	31
<b>3.5. LES BACTERIES SPORULANTES ALTERANTES EN AGROALIMENTAIRE</b>	<b>32</b>
3.5.1. LES PRODUITS DE PANIFICATION ET LA FLORE AEROBIE	32

3.5.2. LES VIANDES CONSERVEES REFRIGEREES SOUS VIDE ET SA NICHE D'ESPECES ANAEROBIES	33
3.5.3. LES PRODUITS LAITIERS ET UNE FLORE SPORULANTE DIVERSIFIEE	35
3.5.4. LES CONSERVES ET LES GERMES LES PLUS THERMORESISTANTS	40
3.5.5. TABLEAU RECAPITULATIF	44
<b>4 - MATERIEL ET METHODES</b>	<b>47</b>
4.1. ECHANTILLONNAGE	48
4.2. MATERIEL BIOLOGIQUE, CULTURE ET DENOMBREMENT	49
4.2.1. MATERIEL BIOLOGIQUE	49
4.2.2. METHODES DE CULTURE	49
4.2.3. METHODES DE DENOMBREMENT	49
4.3. PRODUCTION DES SPORES	50
4.4. ANALYSE DES CONSERVES	50
4.5. DETERMINATION DES PARAMETRES DE THERMORESISTANCE	50
4.6. MODELISATION DES POPULATIONS	51
4.7. IDENTIFICATION PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE	51
4.7.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	51
4.7.2. IDENTIFICATION DES ESPÈCES	52
4.8. DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL D'IDENTIFICATION RAPIDE DES BACTERIES SPORULANTES D'INTERET (ARTICLE 1)	52
<b>5 - RESULTATS-DISCUSSIONS</b>	<b>70</b>
5.1. CARACTERISATION DE LA FLORE D'ALTERATION DES CONSERVES EN FRANCE	71
5.1.1. DESCRIPTION DE LA FLORE RESPONSABLE DE NON STABILITE DE CONSERVES A 55°C (ARTICLE 2)	71
5.1.2. CARACTERISATION DE LA FLORE ENTRANT DANS DES CONSERVERIES DE LEGUMES (ARTICLE 3)	101
5.2. MODELISATION DE LA FLORE SPORULANTE DE LIGNES DE PRODUCTION DE HARICOTS VERTS EN CONSERVES (ARTICLE 4)	118

<b>5.3. EXEMPLE D'UN MOYEN DE MAITRISE DE LA CONTAMINATION EN SPORES DE LIGNES INDUSTRIELLES (ARTICLE 5)</b>	<b>150</b>
<b>6 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>166</b>
<b>7 - REFERENCES (HORS ARTICLES)</b>	<b>172</b>



## 1 - AVANT PROPOS

---

## 1.1. Projet personnel

Ce projet de soutenir une thèse est le fruit d'une réflexion et de l'envie d'une reconnaissance officielle de mon travail. Au départ, cela devait s'effectuer dans le cadre d'une Valorisation par l'Expérience des Acquis (V.A.E.). Mais la volonté d'une vraie reconnaissance scientifique, et après discussion et validation de ma candidature par l'école doctorale de Montpellier, m'a décidé à prendre la voie d'une rédaction d'un manuscrit de thèse avec pour objectif, de pouvoir obtenir le grade de docteur selon un processus plus classique, malgré ma candidature originale.

Même si mon employeur me soutient dans ce projet, et je tiens encore à l'en remercier, ce travail de rédaction constitue et doit être compris comme un travail personnel m'ayant permis d'acquérir l'expérience qu'il me manquait dans le cadre du processus d'acquisition d'un diplôme de doctorat et de pouvoir ainsi, plus efficacement, co-encadrer de futurs doctorants.

## 1.2. Publications scientifiques

### 1.2.1. Articles

- Membré, J.-M., Diao, M.M., Thorin, C., Cordier, G., Zuber, F., **André, S.** (2015). Risk assessment of proteolytic *Clostridium botulinum* in canned foie gras. *International Journal of Food Microbiology*, 210: 62-72
- Durand, L., Planchon, S., Guinebretière, M.H., **S. André**, Carlin, F., Remize, F. (2015). Contamination pathways of spore-forming bacteria in a vegetable cannery. *International Journal of Food Microbiology* 202: 10–19
- Diao, M.M., **André, S.**, Membré, J.-M. (2014). Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679. *International Journal of Food Microbiology* 174: 23–30
- Rigaux, C., **André, S.**, Alberta, I., Carlin, F. (2014). Quantitative assessment of the risk of microbial spoilage in foods. Prediction of non-stability at 55°C of canned green beans caused by *Geobacillus stearothermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 171: 119–128
- 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

- 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 (2): 371–375
- 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
- Prévost, S., **André, S.**, Remize, F. (2010). PCR detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage. *Current Microbiology*, 61 (6): 525–533
- Matamoros, S., **André, S.**, Hue I., Prévost, H., Pilet, M.F. (2010). Identification of lactic acid bacteria involved in the spoilage of pasteurized “foie gras” products. *Meat Science*, 85: 467–471
- Remize, F., **André, S.**, (2009). Molecular detection of spore-forming bacteria in canned food. *Newfood digital*, 1
- André, S.**, Galiana, A., Roux, C.L., Prin, Y., Neyra, M., Duponnois, R. (2004). Ectomycorrhizal symbiosis enhanced the efficiency of inoculation with two *Bradyrhizobium* strains and *Acacia holosericea* growth *Mycorrhiza*, 15: 357-364
- André, S.**, Neyra, M., Duponnois, R. (2003). Arbuscular mycorrhizal symbiosis changes the colonization pattern of *Acacia tortilis* spp. *Raddiana* rhizosphere by two strains of rhizobia *Microbiological Ecology*, 45 (2): 137-144

### 1.2.2. Présentations orales

- André, S.**, Zuber, F., Remize, F., Planchon, S. (2014). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled cans, results of a French ten-year survey. Genotypic and phenotypic characterization of *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica*. *Thermal Processing Conference, Campden BRI*
- André, S.**, Zuber, F., Remize, F., Planchon, S. (2012). Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey. *European Spore Conference, Londres*
- André, S.**, LeBa, D., Zuber, F. (2009). Thermal resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores in different food products: green peas, green beans and sweet corn. *Spore-forming Bacteria in Food, Quimper*

### 1.3. Le CTCPA et la microbiologie

Le CTCPA (Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles) est à la fois un Institut Technique Agro-Industriel (ITAI) qualifié par le ministère de l'agriculture mais aussi l'un des 3 Centres Techniques Industriels (CTI) français en agro-alimentaire. A ce titre, il réalise des missions d'intérêt général grâce à la taxe fiscale affectée et versée par certains industriels français. Ce centre technique, créé en 1950, a pour vocation d'accompagner le développement des industries de certains produits en conserves (légumes, champignons, fruits, tomates, foie gras, potages et plats cuisinés) ainsi que du foie gras pasteurisé et des légumes déshydratés. Si son rôle peut conduire aussi bien à défendre la profession qu'à la représenter auprès des instances nationales ou internationales, voire des organismes de tutelle, le principal objectif du centre est de mener des programmes de recherche collective, notamment au niveau de la sécurité sanitaire, et tout particulièrement en microbiologie.

Pour cette raison, l'Unité EMaiRIT'S (Unité d'Expertise dans la Maitrise du Risque Industriel en Thermorésistants Sporulants) gère une quinzaine de projets de recherche par an pour répondre aux attentes des industriels. Ces projets peuvent concerner la filière du légume déshydraté ou les flores végétatives du foie gras pasteurisé, mais le cœur de métier de l'unité est la connaissance de la flore sporulante dans l'environnement de transformation des aliments tel que la conserve. Les filières concernées sont les légumes, les plats cuisinés, le foie gras, les fruits et tomates. Ce domaine des flores sporulantes en agro-alimentaire correspond au fil conducteur de la recherche collective en microbiologie du CTCPA, même si les environnements et les espèces concernées peuvent être très différents. Ces dernières peuvent aller des espèces psychrophiles aux thermophiles comme aux aérobies-anaérobies facultatifs ou aux anaérobies strictes. De plus, plusieurs thématiques peuvent être abordées selon l'avancement des connaissances, des techniques ou des besoins industriels. Les thématiques de recherche de l'unité concernent en grande partie la recherche appliquée dans le domaine de la conserve.

Dans ce cadre, les projets de recherche collective traités ont conduit au développement de méthodes de dénombrement spécifiques aux spores, ou d'un outil de biologie moléculaire de détection spécifique dans les aliments. Le développement de ces techniques a contribué à déterminer les flux de contamination d'une ligne industrielle. De fait, la caractérisation d'écologies microbiennes de lignes de production a permis d'améliorer la maitrise des flores sporulantes présentes sur celles-ci. Si le traitement thermique est le principe même du procédé d'appertisation, l'impact seul du couple temps / température, ou de tout autre paramètre

pouvant influencer la destruction des spores et/ou la stabilité du produit fini, doivent être étudiés. Actuellement, pour faire suite à l'évolution récente de l'unité, tout comme celle des questions posées par les industriels, ont été développées des méthodes de plus en plus pointues dans le domaine du typage, ou de séquençage, et l'étude de la diversité des écosystèmes caractéristiques des lignes de productions. En parallèle, et à l'aide de collaborations, la modélisation dans le domaine de la microbiologie prévisionnelle est de plus en plus utilisée aussi bien pour comprendre la contamination d'une ligne que l'impact de molécules et/ou de traitement sur la résistance thermique et le recouvrement de la flore d'altération.

Ainsi, au sein de ce manuscrit, il a été repris la même évolution vu que les travaux de cette thèse ont coïncidé avec l'évolution des projets menés au sein de l'unité. Premièrement, dans un chapitre bibliographie, il a été fait état des dernières évolutions des méthodes de caractérisation de flore microbienne ainsi que des connaissances des flores d'altération sporulantes en agroalimentaire. Puis, après l'exposé des matériels et méthodes utilisés, ont été développés les principaux résultats acquis au cours de mes recherches autour des thèmes précédemment exposés. Enfin, pour conclure, les perspectives à venir de ces travaux ont été présentées.

**2 - INTRODUCTION**

---

## 2.1. Modes de préservation des aliments

Dans le tome II de l'Inégalité entre les Hommes, J.J. Rousseau a écrit « Le premier sentiment de l'Homme fut celui de son existence ; son premier soin fut celui de sa conservation ». Et pour cela, la conservation de son alimentation fut l'un de ses principaux soucis. Certains modes de conservations des aliments sont ainsi utilisés par l'homme depuis des millénaires. Un des premiers en date est le fumage des viandes et des poissons qui permet la conservation par un effet bactéricide et bactériostatique, grâce à la présence de phénols et d'acides organiques. Au préalable à cette étape finale du process, il est nécessaire de saler le produit pour des raisons organoleptiques (goût salé), techniques (élimination d'eau) ou microbiologiques (inhibition de croissance bactérienne). Un deuxième procédé traditionnel consiste en l'utilisation du principe de fermentation qui concerne aussi bien les produits carnés, laitiers ou de panification. Dans ce cas, le process intervient principalement dans la transformation du produit alimentaire par la prolifération d'une population microbienne spécifique. En parallèle, cette flore a un rôle sanitaire par compétition avec des flores pathogènes. Pour finir avec ces méthodes ancestrales, le confisage des fruits, au cours duquel le sucre se diffuse dans les cellules végétales par osmose, permet une diminution de l' $A_w$  qui limite, voire inhibe, le développement des micro-organismes.

Un grand nombre de techniques a été développé, surtout depuis le milieu du siècle dernier qui a vu une explosion et une extraordinaire diversification du nombre de procédés utilisables en agro-alimentaire. Un regroupement des techniques anciennes ou actuelles peut être effectué par rapport à leur mode de préservation : l'inhibition de la flore microbienne ou la destruction de celle-ci ; certains procédés de conservation combinant l'application de ces 2 modes.

Les méthodes les plus anciennes agissaient plutôt par inhibition. Aujourd'hui, d'autres techniques fonctionnent de la même manière avec le paramètre température comme la réfrigération ou la congélation. La réfrigération, par abaissement de la température du milieu entre 0 et 10°C, permet un ralentissement du développement de la flore microbienne voir une inhibition complète pour la flore mésophile dans laquelle se situe la majorité des flores pathogènes. Certaines flores, psychrophiles ou psychrotrophes, étant néanmoins capables de se développer dans ces conditions de température, ces produits doivent être consommés avant une certaine date, appelée Date Limite de Conservation (DLC), qui garantit au consommateur un produit sain. La congélation ou surgélation est aussi un procédé utilisant les basses températures mais cette fois inférieure à 0°C (généralement -18°C). A ces températures, l'eau des aliments est congelée, donc non disponible pour les micro-organismes avec une  $A_w$ , par

exemple, de 0,92 à -10°C et 0,81 à -18°C. L'abaissement de l'Aw est le principe même de la déshydratation des aliments qui peuvent alors être conservés longtemps à température ambiante si le taux d'humidité ne remonte pas. Cette technique permet de descendre l'Aw d'un produit à 0,3. La lyophilisation a un impact plus fort et permet, par sublimation de la glace en vapeur d'eau, de sécher instantanément le produit. De fait, les micro-organismes peuvent être conservés longtemps à température ambiante tout en restant viables. Pour finir, il peut être cité la lutte biologique qui a de nombreux avantages commerciaux. Par biopréservation, il faut entendre inhibition des flores indésirables (pathogènes ou d'altération), par compétition avec des flores apportées volontairement dans le produit. Ce mode action est d'ailleurs utilisé plus ou moins directement dans les produits fermentés.

Si l'inhibition de la croissance des microorganismes est le souci majeur lors de la conservation des aliments, l'absence de ces germes apparaît encore plus souhaitable. Dans cet objectif, la destruction des germes peut être associée à des procédés de conservation, en amont des traitements thermiques ou athermiques des aliments, l'intensité de ceux-ci étant liée au mode de conservation utilisé. Par exemple, si le produit est conservé réfrigéré, un traitement thermique modéré peut être appliqué pour détruire uniquement les formes végétatives des micro-organismes. L'intensité d'un traitement thermique obtenu avec un couple temps/température est caractérisée par une Valeur pasteurisatrice (Vp). Celle-ci correspond à un temps équivalent d'un traitement théorique obtenu à une température de référence de 70°C et un paramètre d'inactivation (z) de 10°C. Dans ce cas, seule la destruction des formes végétatives est attendue. Au contraire, si le produit doit être, *in fine*, conservé à température ambiante, il est nécessaire d'appliquer un traitement thermique plus intense permettant la destruction d'un maximum de spores en plus des formes végétatives. Ce procédé est l'appertisation, du nom de son inventeur français, Nicolas Appert, en 1810. De nos jours, le traitement thermique n'est plus appliqué uniquement par un chauffage classique en autoclave. Alternativement, de nouvelles technologies ont été développées incluant des échangeurs continus ou le chauffage ohmique qui peuvent être utilisés avec, pour ce dernier, un possible effet synergique entre la chaleur et le courant électrique. Peuvent aussi être citées les hautes pressions qui, par une transmission adiabatique (i.e. en tous points du produit) de la pression, permettent un traitement très court. Ou encore plus novateur, les plasmas qui sont en cours de démocratisation pour des traitements de surface.



## 2.2. L'appertisation

La conserve étant le produit au cœur de la recherche du CTCPA et de cette thèse, il paraît nécessaire d'y consacrer un aparté. Le procédé de l'appertisation permet d'obtenir des produits stables à température ambiante : les conserves. Cette technologie utilise historiquement le principe d'un traitement thermique détruisant les microorganismes présents dans une matrice alimentaire contenue dans un emballage étanche aux gaz et aux microorganismes. Actuellement, au CTCPA, nous tentons de faire évoluer la définition réglementaire de la conserve, celle-ci datant de 1955, afin de l'adapter aux nouveaux procédés. Aussi, cette version issue d'un consensus interne permet-elle de prendre en compte toutes les évolutions apparues ces dernières décennies, et de prévoir les nouvelles :

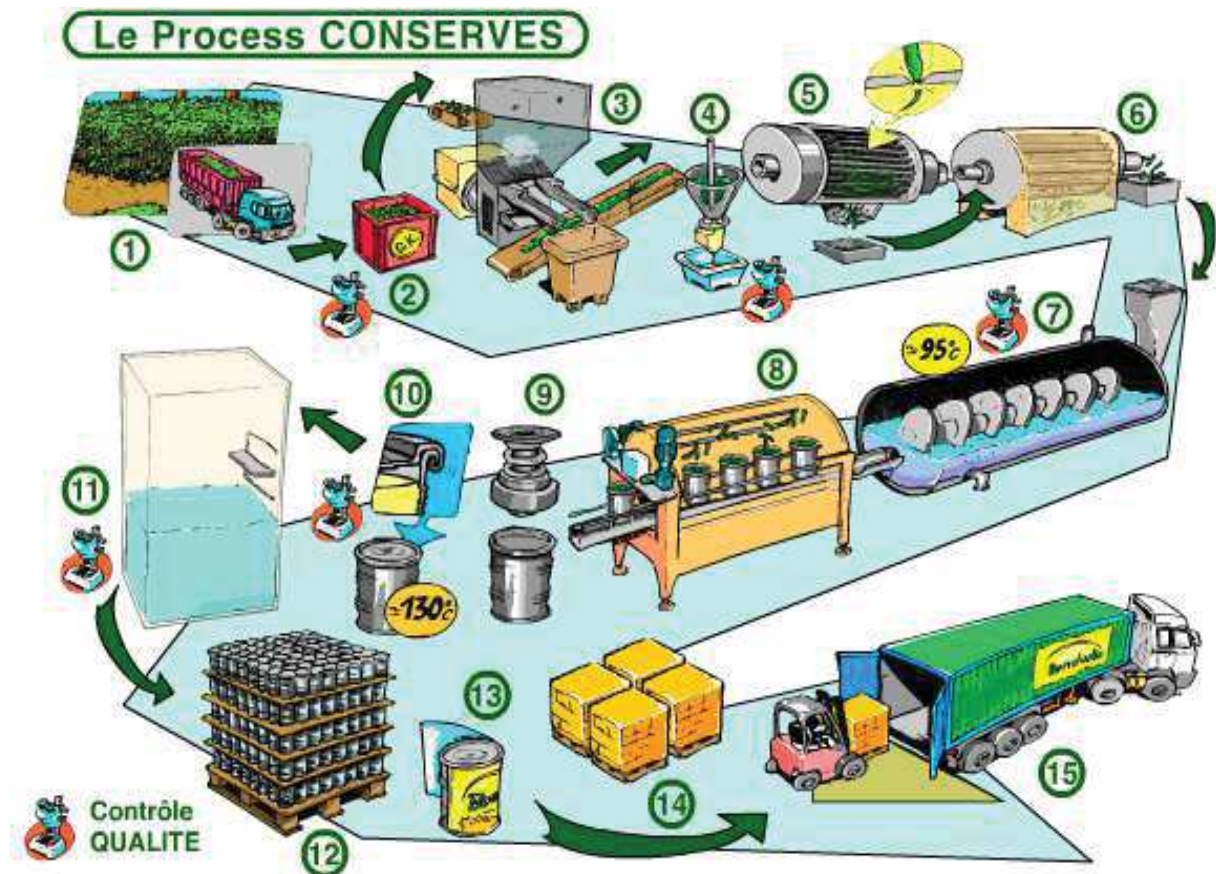
*« Les conserves sont des denrées alimentaires, dont le mode de fabrication permet d'assurer la stabilité biologique du produit dans son emballage intact sur une longue période, dans des conditions normales d'entreposage à température ambiante.*

*Cette conservation est assurée par tout procédé utilisant l'emploi combiné, sans que l'ordre soit défini, des deux techniques suivantes :*

- *conditionnement dans un emballage étanche aux liquides et aux microorganismes, hermétiquement scellé ;*
- *traitement, par la chaleur et/ou tout autre procédé autorisé, ayant pour effet de détruire ou d'inhiber totalement, d'une part les enzymes et d'autre part, les microorganismes et leurs éventuelles toxines.*

*Les denrées ainsi stabilisées sont exemptes de microorganismes susceptibles de croître dans le produit et dont la prolifération pourrait les altérer, présenter un risque sanitaire pour le consommateur ou les rendre impropres à la consommation. »*

Le procédé de fabrication d'une conserve est relativement simple. Suite à la récolte et à l'apport des matières premières dans l'usine, celles-ci sont préparées, pesées puis cuisinées ou non, avant que les contenants finaux soient remplis puis fermés. Les produits sont alors traités thermiquement dans des autoclaves, soit en batch soit en mode continu, puis stockés jusqu'à l'expédition. Pour illustrer ce procédé, une ligne de légumes en conserve a été représentée dans la Figure 1.



- 1 – Production au champ
- 2 – Réception
- 3 – Tri par ventilation
- 4 – Épierrage/lavage
- 5 – Éboutage
- 6 – Calibrage
- 7 – Blanchiment**
- 8 – Emboitage**

- 9 – Jutage**
- 10 – Sertissage**
- 11 – Stérilisation
- 12 – Stockage boîtes blanches
- 13 – Étiquetage
- 14 – Conditionnement stockage
- 15 – Expédition

Figure 1 : Schéma d'une ligne de fabrication de conserves de légumes (Source : Bonduelle). En gras la zone dite « chaude » dans laquelle les légumes montent à plus de 90°C lors du blanchiment et restent à plus de 50°C jusqu'à l'étape de stérilisation.

La première étape en usine est le parage (étapes unitaires de 2 à 6), qui se passe à température ambiante, et a pour premier but de laver les légumes en éliminant notamment les corps étrangers. Puis les légumes sont calibrés en différentes classes pour qu'ils correspondent aux décisions du CTCPA lors d'examen macroscopiques des produits finaux. Ensuite vient la deuxième étape (étapes unitaires 7 à 11) correspondant à la zone chaude dans laquelle les légumes sont toujours à des températures supérieures à 50°C du fait du chauffage par le blanchiment et de la durée courte du transfert jusqu'à la stérilisation (étape unitaire 11). Le blanchiment (étape unitaire 7) a pour rôle principal d'inactiver les enzymes altérant les caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles ou sensorielles des légumes. Pour cela, les

légumes sont plongés dans un bain d'eau maintenue à plus de 90°C. Les légumes sont ensuite convoyés jusqu'aux doseuses avant que les emballages soient sertis (pour les boîtes en métal), thermoscellés (pour les emballages plastiques) ou fermés par un couvercle (pour les bocaux en verre). Enfin vient l'étape clé du process : la stérilisation avant la gestion de stocks.

Classiquement la stérilisation est effectuée à l'aide d'un traitement thermique qui a pour but d'éliminer aussi bien la flore pathogène correspondant à un risque sanitaire pour le consommateur que la flore d'altération conduisant à des pertes économiques importantes pour les industriels. Dans certains cas, le traitement thermique appliqué peut être trop faible, pour des raisons notamment de conservation des qualités organoleptiques du produit, et ne conduit pas à la destruction de la totalité des spores. Dans ce cas, ce sont les caractéristiques physico-chimiques du produit lui-même qui doivent inhiber la germination / croissance des spores survivantes. On peut ainsi citer les cas des conserves acides comme les compotes pour lesquelles les spores non détruites sont inhibées par le pH de l'aliment.

Or dans certains cas, les germes survivants ont la capacité de se développer dans la conserve. Pour détecter rapidement ce problème, les industriels français peuvent s'appuyer sur 2 normes pour contrôler la stabilité de leurs lots : soit ils suivent la norme de référence NF V 08-401 (1997), soit la norme de routine NF V 08-408 (1997). Pour la norme de référence, l'incubation pour les conditions mésophiles est effectuée à 32°C pendant 21 jours alors que la méthode de routine ne dure que 7 jours à 37°C comme à 55°C. Pour des raisons de gain de temps, et comme les normes sont considérées équivalentes, les industriels utilisent donc préférentiellement la méthode la plus courte. L'hypothèse du test de stabilité est que si des germes sont capables de se développer dans la conserve, le seul paramètre limitant leur croissance lors du stockage est la température car elle peut être éloignée de leur température optimale de croissance. Pour cette raison, les échantillons sont incubés afin de favoriser la croissance des germes ayant survécu au traitement thermique, qu'ils soient mésophiles et/ou thermophiles, mais toujours dans l'environnement de la conserve. Cet environnement peut en effet contenir des éléments inhibant le développement des micro-organismes et l'échantillon peut ainsi rester stable malgré la présence de germes viables.

La stabilité d'une conserve se vérifie à plusieurs niveaux, et cela quelle que soit la norme suivie. Premièrement, l'emballage ne doit présenter aucun défaut ou modification comme par exemple, une déformation due à la production de gaz provenant d'un développement microbien. Dans le cas où l'emballage est conforme, la conserve est ouverte et le produit ne doit pas présenter de modification par rapport à l'échantillon témoin. A ce niveau, il est aussi bien observé les modifications de textures, de couleur ou d'odeur. Puis vient la validation de

l'absence de développement microbien par la mesure du pH. Si l'écart, entre l'échantillon incubé et l'échantillon témoin est inférieur à 0,3 unité pH, l'échantillon testé est stable car la variation du pH provient de la variabilité de la mesure et du produit. Si l'écart est supérieur à 0,5 unité pH, alors le lot est considéré non stable, que l'altération soit microbienne ou chimique (cas rare). Dans le cas où la variation de pH se situe entre 0,3 et à 0,5 unité pH, il est nécessaire de confirmer par un examen microscopique si la variation de pH est bien consécutive à un développement microbien ou non. Si l'échantillon est non stable, il est alors important de caractériser des flores présentes.

Dans cette thèse nous nous consacrerons essentiellement à la flore sporulante d'altération des denrées alimentaires, cause importante, voire majeure dans le cas de défaut de fabrication d'origine microbienne, pour les produits traités thermiquement, et donc principale cause de pertes économiques dans ce domaine de l'agro-alimentaire.

### 3 – BIBLIOGRAPHIE

---

### 3.1. Cas particulier des flores d'altération sporulantes en agro-alimentaire

La conservation des produits agro-alimentaires est conditionnée par la maîtrise de leur contamination microbienne. Dans le domaine bactérien, la très grande majorité des bactéries est thermosensible et maîtrisée pour les produits cuits par le traitement thermique appliqué, suivi d'un mode de conservation limitant le développement des germes. Le problème sanitaire étant de première importance en ce qui concerne la santé des consommateurs, aussi bien pour les industriels que pour les agences gouvernementales, les germes pathogènes sont tout particulièrement recherchés dans les plans d'échantillonnage contrôlant la qualité microbiologique des aliments. Cependant, pour les industriels, ces flores pathogènes n'engendrent pas le plus gros impact financier, étant donné qu'elles sont la plupart du temps bien maîtrisées et plutôt moins résistantes que les flores d'altération. Ces dernières ont en effet des caractéristiques de résistance thermique souvent bien plus importantes (Diao *et al.* 2014) même pour la simple forme végétative d'une bactérie. Dans le monde bactérien, il existe une forme bien plus résistante à la chaleur, voire à de nombreux autres stress comme les produits chimiques, qui est la spore.

Les bactéries capables de produire des spores pour résister au stress environnemental sont regroupées dans plusieurs genres bactériens autrefois regroupés dans les 2 genres qui sont les *Bacillus* pour les germes aéro-anaérobies facultatifs ou les *Clostridium* pour les germes anaérobies stricts. Parmi ces germes bactériens, la très grande majorité des espèces comprend majoritairement des germes dits d'altération, sauf pour 2 espèces du domaine agro-alimentaire qui sont *Bacillus cereus* et *Clostridium botulinum* qui constituent des microorganismes reconnus comme pathogènes. Par ailleurs, parmi le groupe de bactéries dites d'altération, certaines espèces, appelées bactéries opportunistes, peuvent être dans certains cas considérées pathogènes comme *Bacillus licheniformis* ou *Clostridium novyi* (Masure *et al.* 1979, Ma *et al.* 2007). Étant donné que les 2 grandes espèces sporulantes pathogènes en agro-alimentaire, qui sont *B. cereus* et *C. botulinum*, sont très étudiées et donc bien documentées, elles n'ont pas été spécifiquement suivies dans cette bibliographie consacrée aux germes sporulants d'intérêt pour les industriels c'est-à-dire les germes d'altération. De plus, *C. botulinum*, n'est pas spécifiquement associé à un produit particulier alors que les autres espèces bactériennes peuvent être relativement spécifiques. *B. cereus*, bien que pathogène peut aussi poser des problèmes d'altération et sera exposé pour ces caractéristiques ou pour une spécificité particulière vis-à-vis de certains produits.

Cette étude bibliographique a été ciblée sur la connaissance des différentes flores sporulantes rencontrées en agro-alimentaire. Cependant, l'observation simple des flores, bien que passionnante, n'est aujourd'hui plus suffisante et, avec l'aide d'outils de biologie moléculaire performants, de nouvelles perspectives sont apparues.

Dans cette revue, il est présenté, dans un premier temps la principale caractéristique physiologique des spores qu'est la thermorésistance. Puis les outils de biologie moléculaire ayant permis des avancées importantes dans la compréhension de l'écologie microbienne avant de finir par la présentation des grands groupes sporulés altérants en agro-alimentaire.

## **3.2. Une des principales caractéristiques physiologiques commune à tous les germes sporulants : la thermorésistance**

### **3.2.1. La spore : forme de résistance**

Ces différentes espèces sporulantes ont la particularité d'être hautement résistantes aux stress environnementaux et aux conditions défavorables grâce à leur forme de résistance qu'est la spore. Cette forme dormante s'obtient en 7 étapes qui correspondent à la sporulation qui a particulièrement été étudiée chez la bactérie modèle *B. subtilis* :

- la 1<sup>ère</sup> étape correspond à la duplication de l'ADN suivant une division asymétrique,
- la 2<sup>ème</sup> étape voit la membrane cytoplasmique s'invaginer en un septum au sein de la cellule qui conduit à la séparation physique des 2 brins d'ADN,
- puis le septum enveloppe le cytoplasme de la plus petite partie cellulaire pour former la préspore dans la 3<sup>ème</sup> étape. On parle alors de maturation de la spore,
- au 4<sup>ème</sup> stade, il y a la formation du cortex et de l'exosporium selon les espèces, entre les membranes,
- la formation des 2 couches se poursuit en parallèle de l'accumulation d'acide dipicolinique de calcium dans le cytoplasme de la spore au cours de cette 5<sup>ème</sup> étape. Dans le même temps, la spore se déshydrate et les protéines de stress SASPs (Small Acide Soluble Spore Proteins) s'accumulent,
- la maturation de la spore se termine lors de cette 6<sup>ème</sup> étape par la synthèse de tunique situées entre le cortex et l'exosporium,
- Au 7<sup>ème</sup> stade, la cellule mère libère la spore par lyse de sa membrane.



Lorsque la spore retrouve un environnement favorable (eau, nutriment, pH, température), le processus de germination est déclenché en 3 étapes pour l'apparition d'une nouvelle cellule végétative :

- la 1<sup>ère</sup> phase correspond à l'activation pour lever la dormance de la spore. Pour cela un choc mécanique, physique ou chimique est généralement nécessaire, s'effectuant dans un environnement hydrique favorable. Lors de ce choc, des métabolites pénètrent à travers les enveloppes endommagées. Le processus autolytique est déclenché,
- la 2<sup>ème</sup> étape est l'initiation où les enzymes hydrolytiques dégradent les différentes enveloppes de la spore dont le cortex qui conduit au gonflement de la spore par réhydratation. Cette étape rend le processus irréversible, la spore a perdu ses caractéristiques de résistance et sa réfringence.
- Enfin lors de la 3<sup>ème</sup> étape appelée excroissance, la paroi sporale devient celle de la bactérie, et entoure, avec sa membrane, le cytoplasme pour donner une nouvelle cellule bactérienne dans laquelle tous les processus liés à la croissance ont repris. Une fois la spore germée, la bactérie en résultant peut se développer et sa prolifération peut aboutir à l'altération des produits.

### 3.2.2. Origine des spores

Ce caractère de résistance des spores est dû à 3 facteurs principaux : la déshydratation du protoplaste, la minéralisation et l'adaptation thermique (Cazemier *et al.* 2001). Mais c'est surtout la déshydratation (Sugiyama, 1951) qui a un rôle dans la protection de l'ADN de la spore. En particulier, le cortex est connu dans son rôle dans la thermorésistance car il contient beaucoup d'acide dipicolinique (Hashimoto *et al.* 1960) et d'ions calcium qui forment des chélates, expliquant la faible teneur en eau de la spore (Grecz *et al.* 1972). Par exemple, le cortex de *Moorella*, qui est un des genres les plus thermorésistants en agro-alimentaire, est très épais et peut expliquer cette hyper résistance (Byrer *et al.* 2000, Moeller *et al.* 2009). De plus, la déshydratation du protoplaste est reliée à la température de croissance de germes. Cela expliquerait la relation entre la température optimale de croissance et le niveau de thermorésistance : les spores de bactéries psychrophiles sont moins thermorésistantes que les mésophiles elles-mêmes moins thermorésistantes que celles des thermophiles (Warth 1978, Gombas 1983).

En plus de caractéristiques intrinsèques à l'espèce, les paramètres environnementaux de la sporulation mais aussi lors du stress thermique influent sur la thermorésistance de la spore.



La composition du milieu influe particulièrement sur la thermorésistance des spores produites (Mazas *et al.* 1995). Par exemple, plus la quantité de sels dans le milieu est importante, plus la thermorésistance est élevée (Cazemier *et al.* 2001). De même, un milieu liquide conduit à des spores moins thermorésistantes que celles provenant d'un milieu solide (Rose *et al.* 2007) ou, lorsque l'activité de l'eau diminue, la thermorésistance augmente (Nguyen Thi Minh *et al.* 2011). Il a aussi été montré qu'une croissance chimioorganohétérotrophe permet d'obtenir des spores jusqu'à trois fois plus résistantes à la chaleur contrairement à une croissance chimiolithoautotrophe (Byrer *et al.* 2000). A côté de ces paramètres étudiés, 2 autres paramètres ont fait l'objet de nombreux articles : la température ainsi que le pH de sporulation. Une augmentation de la température lors de la sporulation, jusqu'à une certaine limite, entraîne une augmentation de la thermorésistance (Williams 1929, Condon *et al.* 1992, Palop *et al.* 1999, Melly *et al.* 2002, Baril *et al.* 2011). De même, l'abaissement du pH du milieu de sporulation conduit à une diminution de la thermorésistance (El Bisi et Ordal 1956, Pang *et al.* 1983, Iciek *et al.* 2006, Guizelini *et al.* 2012). Et il n'y a pas que le niveau d'acidité qui influe la thermorésistance des spores mais le type d'acide peut aussi être impactant (Fernandez *et al.* 1995). De plus, tous ces paramètres peuvent être souche dépendants (Mazas *et al.* 1995). Pour cette raison, pour chaque souche, il existe une température et un pH de sporulation optimaux pour une thermorésistance maximale des spores (Baril *et al.* 2012).

Après les effets du milieu de sporulation, les conditions lors du traitement thermique peuvent aussi influencer la thermorésistance comme la composition du milieu de traitement (Ocio *et al.* 1996). Par exemple, la présence de chlorure de sodium dans le milieu de traitement entraîne une destruction plus rapide des spores (Iciek *et al.* 2006). L'impact du pH du milieu de traitement a été observé par de nombreux autres auteurs notamment pour toutes les études concernant les barèmes de pasteurisation des conserves acides (Monteville et Sapers 1981, Lopez *et al.* 1994, Palop *et al.* 1997, Bocchi *et al.* 2004). Comme pour le milieu de sporulation, la thermorésistance peut être différente selon l'acidifiant du milieu, une relation entre le pKa et la thermorésistance a pu être démontrée (Leguérinel et Mafart 2001) ou l'acide lactique qui est plus efficace que d'autres acides (Palop *et al.* 1997). Palop *et al.* (1999) ont précisé que la thermorésistance des spores est plus faible dans les bouillons acides mais uniquement pour les températures de traitement les plus basses. Car plus les températures de traitement sont élevées, moins les autres paramètres sont sur influencent la thermorésistance des spores.

Leguérinel *et al.* (2005) ont modélisé l'effet du pH et de l'Aw à la fois dans le milieu de traitement et dans le milieu de recouvrement pour être au plus proche des conditions réelles : résistance dans la matrice puis croissance dans celle-ci. Et ils ont confirmé l'effet du pH aussi bien lors du traitement que lors du recouvrement, cette dernière étape ayant l'impact le plus important. Par contre, l'effet de l'activité de l'eau sur la thermorésistance globale est faible car si sa diminution augmente la thermorésistance durant l'étape du traitement thermique, elle limite les capacités de recouvrement après le stress thermique. Il est donc important de tenir compte de cette étape post-traitement pour simuler au mieux les conditions réelles et obtenir une thermorésistance dite globale plus réaliste.

Lors du recouvrement post-traitement, 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) ou lorsque les spores survivantes doivent se développer à un pH plus faible (Bocchi *et al.* 2004, Leguérinel *et al.* 2005). Fernandez *et al.* (1995) ont aussi montré un effet du type d'acidifiant sur la thermorésistance à cette étape comme pour les étapes précédentes. Pour Alderton *et al.* (1974) et Peck *et al.* (1992), c'est l'ajout de lysozyme ou d'œuf dans le milieu de recouvrement qui augmente la thermorésistance apparente.

### 3.2.3. Modélisation de la thermorésistance

La chaleur, qui est un mode très communément utilisé pour aider à la conservation des aliments, est donc un paramètre environnemental très communément étudié vu qu'il permet de mieux connaître le germe à maîtriser. Un des premiers articles faisant référence, encore de nos jours, traite de la maîtrise d'un germe sporulé (*C. botulinum*) grâce à la connaissance précise de sa thermorésistance, permettant de déterminer le temps de traitement nécessaire pour détruire un niveau de population et assurer la maîtrise sanitaire d'un lot (Esty et Meyer, 1922).

C'est au début du 20ème siècle que le paramètre de thermosensibilité  $z$  a été présenté par Bigelow en 1921. Il permet de quantifier l'effet de l'augmentation de température sur la thermorésistance. Ce paramètre correspond à l'augmentation de température diminuant le temps de traitement d'un facteur 10 en conservant la même efficacité létale.

$$z = \frac{(T_{\text{ref}} - T)}{\log D - \log D_{\text{ref}}}$$

Un deuxième paramètre, appelé D (valeur de destruction décimale en unité de temps), a été défini pour caractériser la thermorésistance d'un germe à une température donnée. LE

paramètre D a été proposé par Katzin et al. en 1943. Il est calculé à l'aide d'une équation log-linéaire de 1<sup>er</sup> ordre et correspond au temps de traitement thermique permettant de diviser par 10 le nombre de microorganismes (Figure 2, courbe D).

$$D = \frac{t}{\log N_0 - \log N_t}$$

t : temps de traitement à la température T

N<sub>0</sub> : concentration initiale en micro-organismes

N<sub>t</sub> : concentration survivante en micro-organismes au temps t

Cependant, de nombreuses destructions microbiennes ne suivent pas ce modèle simple. Cerf, dès 1977, a décrit différentes formes de courbes de destruction. Pour les formes les plus communes, soit la résistance thermique diminue au cours du temps et cela correspond à des phénomènes d'épaulement (Figure 2, courbes A et B), soit la destruction diminue avec le temps et c'est un phénomène de trainée qui est observé (courbes E et F). Lorsque les 2 phénomènes sont concomitants pour un microorganisme, la destruction prend l'allure d'une sigmoïde (C).

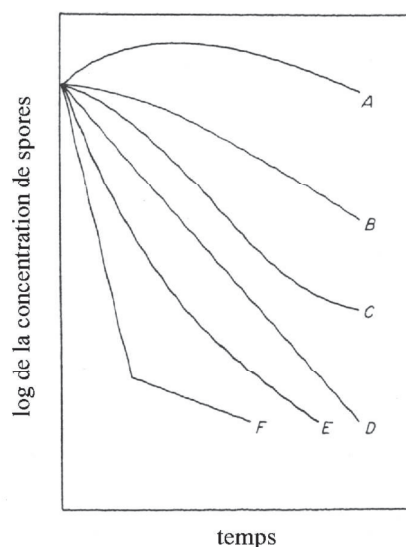


Figure 2 : Les différents types de courbes de survie. A et B, épaulement ; C, sigmoïde ; D, courbe logarithmique ; E, courbe concave ; F, courbe biphasique avec queue. (Cerf, 1977)

Pour tenir compte de ces phénomènes, Mafart *et al.* (2002) ont modifié le modèle de Weibull et ont caractérisé la résistance thermique avec deux paramètres : le paramètre  $\delta$  qui correspond à la durée de la première réduction décimale de la population et le paramètre p,

sans unité, qui informe sur l'allure de la cinétique de destruction. Lorsque la valeur  $p$  est supérieure à 1, la courbe est concave avec un épaulement (Figure 2, courbes A et B), lorsque le  $p$  est inférieur à 1, la courbe est convexe avec une trainée (courbes E et F). Lorsque  $p$  est égal à 1,  $\delta$  devient équivalent à  $D$  car la destruction est log-linéaire (courbe D).

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

$N$  est le nombre de micro-organismes au temps  $t$ ,

$N_0$  est le nombre initial de micro-organismes,

$\delta$  (minute) représentant le temps pour la première réduction décimale

$p$  (sans dimension) est le facteur de forme

Aujourd'hui ces paramètres sont utilisés pour caractériser la résistance à la chaleur, mais peuvent être aussi utilisés par rapport à d'autres facteurs comme le pH ou l' $A_w$ . On ne parle plus alors de  $z_T$  mais  $z_{pH}$  ou  $z_{A_w}$ . Dans ces cas, l'unité est toujours le temps pour le paramètre  $D$  mais lié, non plus à une température, mais un pH ou une  $A_w$ .

### 3.3. Positionnement phylogénique des flores d'altération sporulantes en agro-alimentaire

Les premières définitions de phylogénie bactérienne sont issues des méthodes dites pasteuriennes basées sur des observations au microscope et l'utilisation des voies métaboliques. Depuis l'avènement de la biologie moléculaire, l'étude de la similarité entre les séquences nucléotidiques a permis la création de la classification moderne (Woese et Fox 1977). Aujourd'hui, selon les auteurs, le degré d'homologie entre deux bactéries appartenant à la même espèce doit être supérieur à 70 % de similarité d'ADN/ADN ou 97% d'identité de la séquence codant pour le gène ribosomique 16S (Stackebrandt et Goebel, 1994).

Au niveau des microorganismes, il existe aujourd'hui 3 branches bien distinctes :

- les *Eucarya*, organismes pluricellulaires, dans lesquels on trouve par exemple les champignons,
- les *Bacteria*, organismes unicellulaires procaryotes, qui se retrouvent dans tous les environnements et présentent de nombreuses formes (en bâtonnets, coques ou spirales),
- les *Archea*, qui ont été séparées des *Bacteria* par George *et al.* (1977). Ces archaebactéries possèdent des caractéristiques physiologiques extrêmophiles.

Suite à la mise à jour de la classification (Wange et al 1997), un phylum de la branche des *Bacteria* contient la majorité des bactéries retrouvées en agroalimentaire : le phylum des *Firmicutes*. Les Firmicutes (Firmus cutis : peau dure) sont des bactéries en majorité Gram + dont la taxonomie est régulièrement mise à jour depuis l'avènement des techniques moléculaires de classification (Rosenberg *et al.* 2014). Les bactéries contenues dans ce phylum sont extrêmement diversifiées avec des germes aérobies ou non, sulfita ou sulfito-réducteurs, symbiotiques ou parasites, photosynthétiques ou non, psychrophiles à thermophiles voir extrêmophiles, et de conformation allant du type bâtonnets, à hélicoïdes ou coques.

Le niveau inférieur au phylum contient quatre classes. Dans cette thèse, l'intérêt a spécifiquement porté sur 2 classes caractérisées schématiquement par leur capacité à tolérer et/ou utiliser l'oxygène : les bactéries anaérobies strictes que sont les *Clostridia* et les bactéries aérobies-anaérobies facultatives que sont les *Bacilli* (Tableau 1). Si l'on continue à descendre de niveau phylogénétique, tout en s'intéressant aux germes les plus résistants que sont les bactéries sporulantes, 3 ordres ressortent : les *Thermoanaerobacterales*, les *Clostridiales* et les *Bacillaceae*. Les *Thermoanaerobacterales* contiennent des germes anaérobies thermophiles tels que les genres *Moorella*, *Thermoanaerobacterium* ou *Thermoanaerobacter*. Toujours dans les flores anaérobies strictes, il y a toutes les espèces de l'ordre des *Clostridiales* qui contient tout particulièrement le genre initial appelé *Clostridium*, genre qui a explosé ces dernières années en divers genres, voire en divers ordres comme les *Thermoanaerobacterales* avec l'avènement de la biologie moléculaire. Les germes aérobies-anaérobies facultatifs sont rassemblés dans l'ordre des *Bacillales* qui contient plusieurs familles de bactéries sporulantes telles que les *Bacillaceae* avec les genres *Bacillus* ou *Geobacillus*, les *Alicyclobacillaceae* (*Alicyclobacillus*), les *Paenibacillaceae* (*Paenibacillus*) mais aussi des familles non sporulantes pathogènes comme les *Listeriaceae* (avec l'espèce *Listeria monocytogenes*) ou *Staphylococcaceae* (*Staphylococcus aureus*).

Tableau 1 : Focus sur le phylum des *Firmicutes* et des principaux genres bactériens sporulants en agroalimentaire \* (rdp.cme.msu.edu 18/03/2015)

Classe	Ordre	Famille	Espèces	Genre*
Bacilli	Bacillales	<i>Alicyclobacillaceae</i>	29	<i>Alicyclobacillus</i>
		<i>Bacillaceae 1</i>	223	<i>Bacillus, Geobacillus</i>
		<i>Bacillaceae 2</i>	138	
		<i>Listeriaceae</i>	11	
		<i>Paenibacillaceae 1</i>	167	<i>Paenibacillus</i>
		<i>Paenibacillaceae 2</i>	8	
		<i>Planococcaceae</i>	72	
		<i>Sporolactobacillaceae</i>	20	
		<i>Staphylococcaceae</i>	89	
		<i>Thermoactinomycetaceae 1</i>	18	
		<i>Thermoactinomycetaceae 2</i>	7	
	<i>Bacillales Incertae sedis, sedis X, XI et XII</i>	5, 1, 7, 20		
	Lactobacillales	<i>Aerococcaceae</i>	17	
		<i>Carnobacteriaceae</i>	39	
		<i>Enterococcaceae</i>	56	
		<i>Lactobacillaceae</i>	168	
		<i>Leuconostocaceae</i>	41	
<i>Streptococcaceae</i>		85		
Clostridia	Clostridiales	<i>Clostridiaceae 1</i>	135	<i>Clostridium</i>
		<i>Clostridiaceae 2</i>	13	
		<i>Clostridiaceae 3</i>	5	
		<i>Clostridiaceae 4</i>	2	
		<i>Eubacteriaceae</i>	26	<i>Garciella</i>
		<i>Gracilibacteraceae</i>	2	
		<i>Heliobacteriaceae</i>	9	
		<i>Clostridiales Incertae Sedis III</i>		<i>Thermoanaerobacterium</i>
		<i>Clostridiales Incertae Sedis IV, XI, XII, XIII, XIV, XVI, XVII, XVIII</i>	1, 30, 3, 6, 3, 1, 10, 6	
		<i>Lachnospiraceae</i>	107	
		<i>Peptococcaceae 2</i>	32	<i>Desulfutomaculum</i>
		<i>Peptococcaceae 1</i>	24	
		<i>Peptostreptococcaceae</i>	36	
		<i>Ruminococcaceae</i>	49	
		<i>Syntrophomonadaceae</i>	15	
		<i>Incertae Sedis IV, XI</i>	2,7	
		<i>Peptococcaceae I</i>	1	
	<i>Clostridiales incertae sedis</i>	1		
	<i>Defluviitaleaceae</i>	1		
	Halanaerobiales	<i>Halanaerobiales</i>	12	
		<i>Halobacteroidaceae</i>	15	
	Thermoanaerobacterales	<i>Thermoanaerobacteraceae</i>	45	<i>Caldanaerobacter, Gelria, Moorella, Caldanaerobius</i>
		<i>Thermodesulfobiaceae</i>	3	
Natranaerobiales	<i>Natranaerobiaceae</i>	4		
Thermolithobacteria	Thermolithobacterales	<i>Thermolithobacteraceae</i>	2	
Negativicutes	Selenomonadales	<i>Acidaminococcaceae</i>	5	
		<i>Veillonellaceae</i>	69	

Grâce à l'évolution technologique des outils moléculaires en particulier, les possibilités d'études des bactéries se sont fortement diversifiées en permettant de répondre à différentes questions ou besoins.

### **3.4. Les outils de biologie moléculaire au service de l'écologie microbienne**

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de nombreuses avancées ces dernières années. Et cela, aussi bien au niveau de simples identifications qu'au niveau de la détermination de la dynamique de population ou de l'évolution d'une population d'une ligne de production.

L'écologie microbienne consiste à étudier la biodiversité, c'est-à-dire l'ensemble des populations microbiennes caractérisant un environnement spécifique. Au-delà de l'intérêt fondamental que peut présenter ce type d'étude, les données peuvent contribuer à une application directe comme notamment la sélection d'espèces microbiennes bénéfiques dans le cadre de fermentation ou le contrôle d'espèces altérantes dans le procédé, mais également la mise en évidence d'espèces indicatrices de certaines caractéristiques du milieu (et comme application de défauts thermiques de traitement, de risques de contamination par exemple).

De nombreuses techniques permettent de réaliser ce type d'études. Elles peuvent tout d'abord être séparées en 2 classes : celles qui sont culture-dépendantes et celles pouvant s'affranchir de cultures des microorganismes. Au cours de ces vingt dernières années, les méthodes de biologie moléculaire ont progressivement remplacé les méthodes phénotypiques qui étaient l'outil de base des études sur la diversité, devenant aujourd'hui un outil quasi incontournable et complémentaire pour l'étude de la diversité bactérienne. La diversité 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 génomique bactérien dont la taille du chromosome varie généralement entre 1,5 et 13 millions de paires de bases selon l'espèce.

Le typage moléculaire des bactéries nécessite l'élaboration d'empreintes génétiques des bactéries. Actuellement, les méthodes de typage 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 classer les bactéries en utilisant la présence et la taille des fragments obtenus par amplification et/ou digestion enzymatique de

l'ADN génomique. Dans ce cas, soit l'ADN est directement utilisé (PFGE) soit il doit être amplifié au préalable (PCR et techniques dérivées)

- 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.

Les techniques basées sur l'analyse des profils électrophorétiques sont nombreuses et sont choisies 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'échantillon, avec la garantie que le résultat de l'analyse ne provienne que de l'analyte,
- la typabilité : capacité d'obtenir un résultat positif pour chaque souche étudiée,
- la répétabilité : conditions où les résultats d'essais 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'essais 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 retenue repose sur plusieurs critères : la capacité à appliquer la technique à un grand nombre d'échantillons, l'accessibilité de la technique, et enfin le coût du matériel et des réactifs nécessaires, surtout dans le cas d'applications industrielles. Pour l'analyse électrophorétique soit l'ADN complet est directement analysé (PFGE), soit l'ADN est amplifié avant d'être analysé (PCR et dérivés).

#### 3.4.1. Analyse de l'ADN total

Plusieurs techniques s'appuient sur l'analyse de l'ADN total pour l'analyse aussi bien de la diversité supra-spécifique que de la diversité infra-spécifique. En effet, classiquement la définition moderne de l'espèce microbienne s'appuie sur la similarité ADN/ADN de souches qui, au sein d'une même espèce doit être supérieure à 70%. Par ailleurs, en ce qui concerne la diversité infra-spécifique, la technique de référence utilise également l'analyse de l'ADN total : la PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis). C'est une technique qui s'appuie sur la purification douce, sans dégradation d'ADN total (dans des cubes d'agarose) combinée à une digestion par des enzymes de restriction à faible nombre de sites de coupure et d'une



migration électrophorétique qui consiste à alterner l'orientation du champ électrique au cours du temps (Herschleb *et al.* 2007). 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. Cette technique est largement utilisée en épidémiologie (Felix *et al.* 2013) où elle constitue la technique de référence, ou pour l'identification des souches pathogènes comme c'est le cas par exemple pour les souches d'*Escherichia coli* O157 responsables d'intoxication alimentaire (Lanier *et al.* 2009, Arthur *et al.* 2013). 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 tel qu'il a été démontré dans l'industrie alimentaire (Oliveira *et al.* 2006, Dhaisne *et al.* 2013).

### 3.4.2. Analyse de profils issue de la PCR

#### 3.4.2.1. L'AFLP (*Amplification Fragment Length Polymorphism*)

C'est la seule technique où l'ADN entier est amplifié par PCR, les techniques suivantes n'utilisent que des séquences particulières du génome.

Cette technique correspond à une hydrolyse de l'ADNg par deux enzymes de restriction (l'une à site rare et l'autre à site fréquent dans le génome) puis à la ligature des adaptateurs et l'amplification des fragments de restriction à l'aide d'amorces spécifiques des adaptateurs. L'inconvénient majeur de la méthode est la nécessité d'utiliser un équipement d'analyse automatisé lorsque le nombre de fragments est trop élevé (Mortimer et Arnold 2001). Plusieurs équipes ont utilisé cette technique pour établir des liens phylogénétiques au sein d'un genre ou une espèce d'une population industrielle (Kubo *et al.* 2011, Oomes *et al.* 2007, Tourasse *et al.* 2011).

#### 3.4.2.2. La PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La PCR peut être utilisée directement lorsque des amorces spécifiques à la cible, gène spécifique ou séquence spécifique du germe étudié, sont développées. Elle peut être soit simplex soit multiplex lorsqu'elle cible respectivement, un ou plusieurs gènes cibles à la fois. Cette technique simple et peu coûteuse, mais limitée, ne permet de détecter ou d'identifier généralement qu'au niveau du genre ou de l'espèce (Bienvenue *et al.* 1999, Broda *et al.* 2003, Cremonesi *et al.* 2012, Bassi *et al.* 2013), plus rarement de la souche.

Elle est donc surtout utilisée associée à d'autres techniques permettant une meilleure spécificité selon les profils obtenus.

#### 3.4.2.3. *La RFLP (restriction Fragment Length Polymorphism)*

Cette méthode est la combinaison d'une PCR et d'une digestion par des enzymes de restriction avec un nombre élevé de sites de coupure suivie d'une migration électrophorétique. Optionnellement, elle peut être suivie d'un transfert sur membrane (Southern blot) puis, d'une hybridation à l'aide de sondes marquées spécifiques (Schumann et Pukall 2013). 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. Classiquement, elle s'applique sur les produits d'amplification de gènes ribosomiques 16S obtenus par PCR à partir d'amorces universelles (Lane, 1991). Dans ce cas, elle porte le nom de PCR RFLP16S ou ARDRA pour Amplified Ribosomal Dna Restriction Analysis. En agroalimentaire, la RFLP a été utilisée pour le typage d'espèces bactériennes telles que *Bacillus* spp. (Shangkuan *et al.* 2000), *Lactobacillus delbrueckii* (Giraffa *et al.* 2003) et *Staphylococcus aureus* (Mehndiratta *et al.* 2009). Par ailleurs, elle a été utilisée pour l'analyse de la diversité d'isolats d'une flore de munster (Feurer *et al.* 2004).

#### 3.4.2.4. *La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*

L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe a été décrite pour la première fois en 1990 simultanément par Williams *et al.* et par Welsh et Mc Clelland. Il s'agit d'une réaction de PCR dans laquelle les fragments d'ADN sont amplifiés de façon aléatoire grâce à l'utilisation d'une amorce courte unique définie de façon arbitraire (9 à 15 pb). Un intérêt de cette méthode est de pouvoir amplifier par PCR différentes portions du génome sans avoir à connaître sa séquence. Les conditions de spécificité plus drastiques en M13-PCR qu'en RAPD permettent d'obtenir une meilleure reproductibilité des amplifications PCR pour l'étude de la variabilité des isolats du groupe *B. cereus* (Guinebertière *et al.* 2003) ou des contaminants du lait en poudre (Ronimus *et al.* 2003).

#### 3.4.2.5. *La PCR-DGGE ou TGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis ou Temperature Gel Gradient Electrophoresis)*

Ces techniques combinent une amplification PCR à l'aide d'amorces spécifiques (ciblant le gène *rpoB* par exemple) ou universelles (ciblant le gène ribosomal 16S) bornées en GC à

l'extrémité 5' (évite la dénaturation totale des produits lors de la migration dans le gel) suivie d'une migration en gel de polyacrylamide avec un gradient d'agents dénaturants (Urée et formamide, DGGE) ou des gradients de température (TGGE). Alternativement, le couplage à l'une des extrémités est assuré soit par un GC Clamp (une séquence riche en G+C, résistante à la dénaturation, soit par une molécule de psoralène qui est au départ liée à l'une des amorces et qui permet le couplage chimique aux UV avant la migration sur le gel dénaturant. Cette technique s'appuie sur la stabilité relative des molécules d'ADN en fonction de leur contenu en G+C (plus riches en liaisons hydrogène et donc plus résistant à la dénaturation que des molécules riches en A+T, comprenant moins de liaisons hydrogènes et donc plus instables). Cette technique est très utilisée pour l'étude d'un écosystème complexe (Cocolin *et al.* 2004, He *et al.* 2009).

Ces différentes techniques précédemment citées ont été comparées dans des revues par différents auteurs et chacun y présente des avantages et des inconvénients (Brightwell *et al.* 2009, Doulgeraki *et al.* 2012).

#### 3.4.2.6. *La SSCP ou single strand conformation polymorphisme*

Cette technique s'appuie sur la structure 3D des ARN 16S simple brin qui varie avec la séquence. Cette technique a été, entre autre, utilisée pour la caractérisation de la flore résidente et de contamination microbiologique de lignes de production de munster (Feurer *et al.* 2004). L'intérêt de cette technique est qu'elle peut être couplée à une électrophorèse capillaire pour augmenter la résolution. Dans ce cas, l'une des amorces utilisées pour la PCR est marquée avec une molécule phosphorescente ou luminescente qui permet la détection automatique du fragment par un scanner. Bien que plus chère, cette technique est utilisée par des industriels car elle permet un suivi automatisé des profils et la détection systématique de pics surnuméraires, caractéristiques d'une contamination au sein d'une flore alimentaire complexe (Feurer *et al.* 2004, Dorn-In *et al.* 2013).

#### 3.4.2.7. *La MLVA (Multi Locus Variable-number-tandem-repeat (VNTR)*

##### *Analysis*

Cette technique s'appuie sur les microsatellites, les VNTR (Variables Number of Tandem Repeats) pour du génotypage. Les VNTR sont des courtes séquences d'ADN présentes en copies répétées sur un locus.

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. Il s'agit de courtes séquences d'ADN répétées successivement sur un même locus dont le nombre varie en fonction des individus. L'avantage de l'évolution rapide des VNTR qui génère une variabilité entre individus est aussi le principal défaut de cette méthode qui ne peut être utilisée que sur de courtes périodes d'études d'épidémiologie comme pour *Bacillus anthracis* (Keim *et al.* 2000) ou *Clostridium tyrobutyricum* (Nishihara *et al.* 2014) par exemple. Sur des lignes de production industrielles, cette technique a aussi été utilisée pour typer le genre *Geobacillus* (Seale *et al.* 2012).

#### 3.4.2.8. La REP PCR (*Repetitive element sequence-based PCR*)

L'amplification des régions répétées du génome est utilisée pour le typage au sein d'une espèce (Gilson *et al.* 1984). Lorsque la taille d'une séquence entre 2 amorces est suffisamment courte, la région peut être amplifiée et donner un fragment d'ADN différenciable par sa taille suite à une migration en gel d'agarose. L'ensemble de bandes amplifiées donne alors un profil spécifique à une souche. Cette technique se caractérise par une utilisation facile et une bonne reproductibilité et a été utilisé pour des études d'écologie (Guinebertière *et al.* 2001) pour le génotypage au sein d'espèces de *Geobacillus* ou *Bacillus* comme *Geobacillus stearothermophilus*, *B. cereus* et *Bacillus thuringiensis* (Cooper et Mc Killip 2006, Manzano *et al.* 2009, Durand *et al.* 2015).

### 3.4.3. Les techniques de séquençage

#### 3.4.3.1. Le séquençage

Le séquençage était initialement basé sur la technique de Sanger et Coulson (1975) dans laquelle les 2 brins d'ADN sont séparés puis le brin complémentaire est synthétisé à partir de didésoxyribonucléotides (absence du groupement hydroxyle en 3') marqués à l'aide de 4 fluorochromes différents. La méthode de séquençage Sanger a permis d'effectuer les premiers inventaires moléculaires basés sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S.

Le séquençage peut être réalisé sur les 2 types d'acides nucléiques : l'ADN et l'ARN. Le séquençage de l'ADN est le plus fréquemment utilisé pour obtenir l'information génétique totale d'une espèce mais aussi pour déterminer l'ensemble des populations dans un écosystème avec des notions de proportions mais cette technique n'est pas quantitative. Le

séquençage de l'ADNc synthétisé à partir de l'ARN, ou RNA seq pour RNA sequencing, est utilisé pour étudier l'expression des gènes ainsi que leur régulation au sein d'un organisme. Une étude de la fonctionnalité des gènes par la méthode de PCR quantitative permet de consolider les résultats obtenus en séquençage.

Depuis ces 10 dernières années, le séquençage se fait de manière « haut débit » (High Throughput Sequencing) et est aujourd'hui devenu accessible à tous. Le développement de ces technologies de séquençage de deuxième génération (Next Generation Sequencing, NGS) offre la possibilité, à travers le séquençage des génomes microbiens (génomique) ou des ADN totaux d'un environnement (Métagénomique) ou un séquençage cible d'une partie de ces génomes (Métagénétique), d'explorer et d'étudier la diversité génétique et fonctionnelle de ces micro-organismes sans extraction préalable, directement au sein de leur milieu. Les différentes techniques ont fait l'objet de nombreux articles (Mardis 2008, Ansorge 2009, Delseny *et al.* 2010, Shokralla *et al.* 2012). Aujourd'hui, une nouvelle technologie est en train de se mettre en place, le NNGS (pour New Next Generation Sequencing) qui consiste à travailler sur une seule molécule d'ADN sans amplification. Plusieurs technologies de séquençage existent et diffèrent selon la quantité et le type de données générées ainsi que sur la qualité des données. Ces techniques ont été utilisées pour caractériser la diversité spécifique et fonctionnelle de flores extrêmement complexes telles que les tubes digestifs humains et animaux (Nielsen *et al.* 2014) et les flores technologiques complexes parmi lesquelles, les flores fromagères (Bora *et al.* 2014)

#### 3.4.3.2. *Le séquençage de nouvelle génération*

Le pyroséquençage est dérivé de la méthode de Sanger. Il consiste à incorporer des désoxyribonucléotides triphosphates l'un après l'autre. La libération de phosphate est utilisée pour générer un signal lumineux (réaction de transformation de la luciférine en oxyluciférine par la luciférase utilisant l'ATP libéré). L'intensité du signal est proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés dans le brin d'ADN en synthèse.

En amont du pyroséquençage, une amplification de l'ADNr 16S ou de l'ADN total peut être réalisée. La PCR se fait en milieu liquide (technologie 454) contrairement à la technologie Illumina/Solexa qui se fait en milieu solide ou selon la technologie d'Applied biosystems appelée « SOLID » qui est intermédiaire. Cette technique 454 est largement utilisée jusqu'à aujourd'hui pour l'écologie microbienne de sols et dans le domaine agroalimentaire (Ercolini *et al.* 2011, Jung *et al.* 2011, Lopez *et al.* 2011, Hu *et al.* 2012).

Une autre technologie est celle d'Ion torrent. Elle consiste à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN simple brin grâce à une polymérase. Lorsqu'un nucléotide est incorporé (un seul nucléotide différent est présenté à la fois dans le milieu), la réaction chimique libère un proton. Ainsi, en détectant qu'un ou plusieurs protons ont été libérés lorsqu'un nucléotide précis se trouvait dans le milieu de réaction, le séquenceur peut, étape après étape, déterminer la séquence d'ADN présente dans le puits.

Enfin, la dernière technologie (3<sup>ème</sup> génération) d'Oxford Nanopore, permettrait de séquencer un génome à partir d'une seule molécule d'ADN (Schadt 2010). Le séquenceur peut se présenter sous la forme d'une clef USB. La molécule d'ADN passe à travers un nanopore constitué de protéines couplées à des capteurs. Chaque nucléotide est détecté grâce à son champ électrique qui lui est propre de par son encombrement stérique.

À l'issue du séquençage, les données brutes sont des séquences d'ADN sous forme de fragments qu'il va falloir réassocier pour former des contigs jusqu'à n'obtenir qu'une seule molécule : le chromosome bactérien. Cette étape se fait grâce à un assembleur informatique. Il peut se faire à l'aide d'un génome de référence par alignement et comparaison des séquences, on parle de séquençage *de novo*. L'assemblage est suivi de l'annotation des gènes pour effectuer la cartographie la plus complète du génome.

#### 3.4.3.3. *MLST (Multilocus Sequence Typing)*

Plus classiquement, sans passer par le séquençage d'un génome ou d'un métagénome, la MLST s'appuie sur le séquençage de plusieurs gènes de ménage (en général autour de 7) au sein de collections de souches de façon à en déterminer le type MLST, ceci à des fins d'identification ou de suivi épidémiologique. Ainsi, des gènes type ou des régions intergéniques sont typés pour déterminer les variations alléliques. La comparaison entre souches se fait à l'aide de dendrogramme (Spratt and Maiden 1999) ou de bases de données contenant 75 espèces bactériennes (Pérez-Losada *et al.* 2013). Pour les flores alimentaires ou contaminantes d'aliments, La MLST a été utilisé ces dernières années aussi bien dans un but de taxonomie ou génétique des populations (Guinebertière *et al.* 2013, Yang *et al.* 2013) que pour une analyse de la répartition géographique de souches de *Yersinia pestis* (Drancourt *et al.* 2004). Elle a été également menée sur des *Streptococcus agalactiae* isolés du lait pour différencier de souches impliquées dans des mammites bovine de souches impliquées dans des maladies humaines (Brochet *et al.* 2006)

### 3.4.4. Les techniques d'hybridation de l'ADN

#### 3.4.4.1. *Hybridation ADN-ADN*

Cette méthode est encore considérée aujourd'hui comme l' « étalon or » pour déterminer le niveau de parenté entre les espèces, autrement dit pour établir des liens phylogénétiques. (Stackebrandt et Goebel 1994). Le principe de cette méthode repose sur l'hybridation de molécules d'ADN entre elles selon le pourcentage de bases adénine/thymine (AT) et cytosine/guanine (CG). Et plus le pourcentage de bases CG est élevé, plus la température pour dénaturer 50% des doubles brins d'ADN est élevée. C'est cette température de fusion qui permet de relier les espèces entre elles. Encore aujourd'hui, cette technique est utilisée pour faire évoluer la taxonomie (Coorevits *et al.* 2012)

#### 3.4.4.2. *Puce à ADN*

Mais l'utilisation la plus commune du principe d'hybridation ADN/ADN se fait au travers des puces à ADN. Les puces à ADN sont de 2 sortes : les macroarrays qui peuvent contenir jusqu'à 5000 sondes provenant de fragments d'ADN et les microarrays jusqu'à un million de sondes correspondant à des oligonucléotides. La méthode des puces à ADN s'avère être rapide, spécifique et efficace. Les puces impliquent une connaissance des génomes mais elles peuvent être créées à partir de génomes partiels. La production des puces nécessite un appareillage spécifique et coûteux y compris pour la détection de l'hybridation.

Les puces à ADN sont la miniaturisation de l'hybridation permettant d'identifier simultanément des milliers de molécules différentes d'acides nucléiques d'un microorganisme ou d'une population. Avec le nombre de sondes disponibles, il est alors possible d'effectuer de la transcriptomique (Severino *et al.* 2007, Ohtani *et al.* 2013) mais aussi d'étudier la biodiversité microbienne (Garaizar *et al.* 2006, Wanilada *et al.* 2012) notamment dans les aliments altérés (Caspers *et al.* 2012). Elle a permis par exemple de déterminer la diversité de souches de *Brevibacteriaceae* dans les produits laitiers (Forquin *et al.* 2008). Il est à noter que des puces spécifiques ont été mises au point pour typer les clostridies productrices de toxines (Vanhomwegen *et al.* 2013). La création de puce est cependant limitée par le matériel nécessaire et son coût et les applications industrielles restent rares.



Suite à l'avancée de ces technologies d'identification, de caractérisation, il nous a semblé intéressant de faire une revue bibliographique spécifique des germes sporulants d'altération dans le domaine de l'agroalimentaire afin de replacer dans ce domaine large la flore spécifique étudiée au cours de cette thèse.

### 3.5. Les bactéries sporulantes altérantes en agroalimentaire

Lors de ces 30 dernières années, les aliments concernés par des problèmes de bactéries dites sporulantes, peuvent être séparés en 4 groupes : (i) les produits de panification avec des bactéries mésophiles, (ii) les viandes conservées réfrigérées et sous vide avec des espèces psychrophiles, (iii) les produits laitiers comprenant les fromages, le lait pasteurisé et le lait stérilisé avec des genres aussi bien psychrophiles que mésophiles ou thermophiles, (iv) les conserves, divisées en 2 catégories par rapport au risque botulique. On distingue les conserves acides composées de groupes dit très acides ou moyennement acides et les conserves non acides, toutes potentiellement altérées par des espèces mésophiles ou thermophiles.

#### 3.5.1. Les produits de panification et la flore aérobie

Dès 1980, différentes espèces de *Bacillus* comme *Bacillus mesentericus* (aujourd'hui *Bacillus pumilus*) et *Bacillus subtilis* ont été identifiées comme responsables de l'altération de produits de panification se traduisant généralement par un aspect visqueux, une décoloration de la croûte ainsi qu'une odeur de melon (Jackel 1980, Roecken et Spicher 1993). L'une des hypothèses avancée était la diminution des molécules chimiques inhibitrices (Jackel 1980). Cette altération est souvent associée à la présence de *Bacillus* sp dans les matières premières que ce soit le levain, les farines ou le prémix (Bailey et von Holy 1993, Roecken et Spicher 1993, Pepe *et al.* 2003, Certel *et al.* 2009). L'aspect visqueux est dû à une activité enzymatique protéolytique et amylolytique des bactéries sporulantes (Rosenkvist et Hansen 1995, Viedma *et al.* 2011). Ces bactéries posent problème car leur forme sporulée leur permet de résister à la cuisson de quelques minutes à des températures proches de 100°C. La résistance thermique (paramètre D) des 3 espèces majoritaires a été déterminée entre 10 et 56 min à 100°C (Leuschner 1998). Dans les années 1990, plusieurs études ont déterminé la prépondérance de *B. subtilis* et *B. licheniformis* comme espèces altérantes. D'autres espèces de *Bacillus* comme *B. pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megatorium* ou *B. cereus* ont aussi été identifiés (Collins *et al.* 1991, Bailey et von Holy 1993, Rosenkvist et Hansen 1995, Thompson *et al.* 1998). Vu la qualité des identifications à cette époque, Valerio *et al.*



(2012) ont effectué une nouvelle étude sur les matières premières entrant dans la composition des produits de panification en utilisant la spectrométrie par FR-NIR. Sur 13 espèces identifiées, 3 étaient des *Paenibacillus* pour 10 *Bacillus* qui étaient présentes dans plus de 50% des échantillons entre 1 et 100 spores.g<sup>-1</sup>. Avec la technologie utilisée, les auteurs ont identifié *B. amyloliquefaciens* comme espèce majoritaire en lieu et place de *B. subtilis* comme cela avait été avancé dans des études précédentes. Pour lutter contre ces germes d'altération, la piste des substances antimicrobiennes a particulièrement été étudiée (Mc Naughton *et al.* 1998, Pattison *et al.* 2003, Wei *et al.* 2009, Adimpong *et al.* 2012). Ponctuellement, une lutte biologique a été mise en avant avec l'aide de bactéries lactiques comme *Lactobacillus plantarum* et *Leuconostoc mesenteroides* (Pepe *et al.* 2003). De même, l'addition de levain acidifiant le pain a pu permettre une maîtrise des altérations dues à des *Bacillus* (Rumeus et Turtoi 2013).

### 3.5.2. Les viandes conservées réfrigérées sous vide et sa niche d'espèces anaérobies

Dès 1911, Mc Bride puis Sturges et Drake en 1926 identifient le genre *Clostridium* comme principal genre responsable de l'altération, appelé « blown pack » de viande conservée au froid et tout particulièrement par l'espèce *Clostridium putrefaciens*. Il faudra attendre l'avènement des techniques de biologie moléculaire dans les années 1990, pour voir de nouvelles espèces décrites : *Clostridium estertheticum* (Collins *et al.* 1992) *Clostridium algidicarnis* (Lawson *et al.* 1994), *Clostridium frigidicarnis* (Broda *et al.* 1999), *Clostridium gasigenes* (Broda *et al.* 2000b), *Clostridium aglidixylanolyticum* (Broda *et al.* 2000a), *Clostridium frigoris* et *Clostridium bowmanii* (Spring *et al.* 2003). Ces espèces sont tout particulièrement liées aux produits carnés conservés réfrigérés et sous vide. Entre les 2, de nombreuses études ont identifié régulièrement *C. botulinum* ou d'autres espèces de *Clostridium* aujourd'hui renommées. Dans tous les cas, l'altération est caractérisée par une production de gaz importante conduisant à un fort gonflement de l'emballage plastique ainsi que par la production d'odeur forte en plus de l'altération de la viande telle qu'une perte de couleur ou de texture (Kalchayanand *et al.* 1989). Cette altération peut provenir d'une contamination initiale très faible. Clemens *et al.* (2010) ont pu mettre en évidence qu'une spore de *C. estertheticum* par produit pouvait suffire pour altérer du bœuf ou de l'agneau lors de la conservation. Ces espèces sont classées selon leur température de croissance comme des psychrotrophes (optimum à 12°C et croissance à 37°C) ou des psychrophiles (optimum à 8-12°C et absence de croissance au-dessus de 30°C). Lors de la caractérisation des minima de

température de croissance, il n'est pas rare qu'une altération ait été observée à -1 ou -2°C (Moorhead et Bell, 1999, Broda *et al.* 2000b, Yang *et al.* 2009, Adam *et al.* 2010). Si de nombreuses espèces sont régulièrement isolées, les principales (citées précédemment) sont régulièrement isolées sur un seul et même échantillon, ce qui laisse penser qu'il pourrait exister un effet synergique entre les espèces (Broda *et al.* 1996, Moschonas *et al.* 2009). L'association des caractéristiques de psychotolérance et d'anaérobie en fait des espèces tout spécialement connues pour la difficulté à les isoler et à travailler avec (Broda *et al.* 1996, Broda *et al.* 1998). De nombreuses études sont publiées dans le but de proposer de nouveaux milieux d'isolement (Perkins 1964, Broda *et al.* 1998, Moschonas *et al.* 2009). En parallèle, quelques essais de définition de méthodes d'identification rapides ont été publiés tels que Broda *et al.* (2003) qui a développé un outil spécifique à *C. algidicarnis* et *C. putrefaciens* ou Pichner *et al.* (2012) pour l'espèce *C. estertheticum sensu stricto* ou *C. estertheticum* like. Au CTCPA, dans le foie gras pasteurisé, l'espèce *C. algidicarnis* a été trouvée majoritairement ces dernières années, après une période de 2 ans où *C. bowmanii* avait été identifié chez plusieurs industriels (données personnelles). Sur cette matrice spécifique, les mêmes défauts sont observés : odeurs fortes et nauséabondes et production de gaz.

Lorsque la source de contamination a été recherchée, la peau des carcasses et les fèces ont rapidement été identifiées comme des réservoirs importants au niveau de l'abattoir. Broda *et al.* (2002) ont identifié que les particules de sols présentes sur les peaux comme les fèces devaient être particulièrement suivies dans les plans de contrôle sanitaire afin de limiter la contamination de l'abattoir par *C. gasigenes* ou *C. estertheticum*. Moschonas *et al.* (2009) ont travaillé sur 1680 échantillons recueillis sur une année, et ont tracé tout particulièrement les espèces *C. estertheticum* et *C. gasigenes*. Ils ont retrouvé jusqu'à 38% d'échantillons positifs à l'abattoir au mois de mai. Et plus étonnant, les 10 à 14% des sols analysés contenaient les 2 espèces. Pour Silva *et al.* (2011), sur les quelques isolats obtenus, seules les espèces *C. gasigenes* et *C. algidicarnis* ont été identifiées et cela, aussi bien sur des échantillons de bœuf altérés que conformes, ou à l'abattoir sur des échantillons de peau, par exemple. La localisation spécifique des *Clostridium* sur les surfaces des viandes, pouvant résulter de contaminations croisées, a été confirmée par les essais de lavages aussi bien à l'eau chaude que froide par Adam *et al.* (2013). Le simple lavage a permis d'augmenter de 12 et 13 jours la DLC par rapport aux échantillons non traités. Les fèces ont aussi été caractérisées comme vecteur de la contamination par des *Clostridium* psychrophiles. Les espèces *C. estertheticum* et *C. gasigenes* ont été dénombrées en forte concentration dans celles-ci (Moschonas 2009).

### 3.5.3. Les produits laitiers et une flore sporulante diversifiée

#### 3.5.3.1. *Le lait frais : la base commune*

Les produits laitiers peuvent être eux aussi altérés par des bactéries sporulantes, qu'ils soient réfrigérés ou stables à température ambiante. Et dans le cas où la fermentation du lait est utilisée, le « risque sporulé » persiste. Dans de nombreuses études, le lait frais peut déjà contenir de fortes concentrations de spores, jusqu'à plus de 5 000 spores.ml<sup>-1</sup> (Mikolajcik et Simon 1978). Dans cette flore, *B. cereus* peut être présent dans plus de 80% des échantillons de lait frais analysés (Meer *et al.* 1991). Dans sa revue bibliographique, Quigley *et al.* (2013) confirme que *B. cereus* est le germe le plus fréquemment à l'origine de l'altération organoleptique de produits laitiers réfrigérés en plus d'être un agent pathogène (Mc Guiggan *et al.* 2002). Dès 1994, Sutherland et Murdoch l'avaient identifié sur l'ensemble de la ligne de production allant de la production à la ferme jusqu'au produit fini réfrigéré.

Lücking *et al.* (2013) a étudié aussi bien les flores d'altération du lait que l'environnement de production. Dans son étude, 43 espèces différentes ont été détectées. Elles appartenaient à 11 genres différents de bactéries sporulantes provenant pour 75% de produits altérés et 25% de lignes de fabrication. Le groupe *B. cereus* et l'espèce *B. licheniformis* sont apparus les plus fréquemment. Et lorsqu'une sélection a été effectuée pour détecter les HHRS (Heat Highly Resistant Spores = spores hautement thermorésistantes), les espèces *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* ou *Bacillus smithii* et *Geobacillus pallidus* ont été majoritaires respectivement pour les flores mésophiles ou thermophiles. *G. stearothermophilus* est l'espèce qui est ressortie majoritaire dans les flores thermorésistantes (sélection par un traitement de 10 min à 100°C). Cette grande diversité est due à la variabilité de produits analysés provenant de process très différents. D'autres auteurs ont mis en évidence une saisonnalité des spores contaminantes mésophiles ou psychrophiles dans le lait pouvant se retrouver dans le lait pasteurisé (Sutherland et Murdoch 1994). L'hiver est la saison la plus favorable pour les germes mésophiles alors que l'été et l'automne génèrent la présence importante des *Bacillus* psychrophiles. De plus, des auteurs comme Muir *et al.* 1986 relient la contamination de l'usine directement à la contamination de l'étape précédente : la ferme. Comme dans d'autres études (Martins 1981, Phillips et Griffiths 1986), *B. pumilus*, *B. licheniformis* et *B. subtilis* avaient été identifiés comme les espèces les plus fréquentes à plus de 20% des isolats identifiés. Dans le sol, une variation jusqu'à 87 000 spores butyriques/g de matière sèche a été mise en évidence par Gouet *et al.* (1972).

Il faut noter que toutes ces études citées portent uniquement sur des flores aérobies. Or comme il est discuté par la suite avec l'altération des fromages, aucun genre aérobie n'est concerné car ce sont des germes exclusivement anaérobies qui ont été identifiés dans ce type de produit (*Clostridium*). Cela confirme que les études d'occurrence ne sont valables que pour les germes recherchés et, comme les méthodes ne sont pas universelles, des pans entiers de l'écologie microbienne peuvent être occultés par la simple méthodologie d'isolement utilisée. Les techniques de biologie moléculaire appliquées directement sur les populations totales peuvent permettre de limiter ce biais analytique. Cependant, dans le cas de l'altération des fromages par gonflement, des études spécifiques sur les anaérobies ont mis en évidence un lien direct entre la qualité du lait liée notamment à l'ensilage et l'altération du produit fini (Bergère *et al.* 1968, Cremonesi *et al.* 2012). Pour Dasgupta et Hull (1989), si les *Clostridium* butyriques sont observés toute l'année dans le lait, l'automne et l'hiver correspondent aux périodes où plus de 50% des échantillons contiennent au moins 1 spore / 5 ml de lait ; cela est corrélé par l'auteur aux saisons où l'altération du Gouda ou du fromage suisse par *C. tyrobutyricum* est la plus fréquente. Dans une autre étude (Garde *et al.* 2011), la période estivale est apparue comme la plus favorable pour une contamination en sporulants anaérobies du lait, et donc, au défaut d'altération du fromage Manchego. A cette saison, selon ces auteurs, 97% des échantillons sont contaminés et contiennent en moyenne 14,5 spores.ml<sup>-1</sup>.

Cette diversité des espèces identifiées doit être reliée à la grande variété des produits laitiers et de leur mode de production. Aussi, dans cette revue bibliographique des produits laitiers, un découpage a été effectué avec tout d'abord les produits traités puis réfrigérés tel que le lait pasteurisé, puis les produits stables à température ambiante que sont les laits stérilisés et la poudre de lait et pour finir par les produits fermentés correspondant aux fromages.

#### 3.5.3.2. *Le lait pasteurisé : le lait réfrigéré*

Le lait pasteurisé se conserve à température réfrigérée car le traitement thermique doux qui est appliqué ne permet pas la destruction des spores d'espèces mésophiles capables de se développer lors du stockage (Raleya *et al.* 1998, Fromm et Boor 2004, Durak *et al.* 2006, Raneiri et Boor 2009, Ivy *et al.* 2012). Ce traitement de pasteurisation est dit HTST pour High Temperature Short Time (haute température et temps court) et correspond à un traitement de 15s à 72°C. Avec ce traitement, ou tout autre traitement équivalent, la DLC du produit est de 2 à 3 semaines (Simon et Hansen 2001, Hayes *et al.* 2002, Fromm et Boor 2004, Gandy *et al.* 2008, He *et al.* 2009).

A partir de 2004, différents auteurs ont mis en évidence la prépondérance parmi les bactéries sporulantes aérobies psychrophiles du genre *Paenibacillus* (>50%) par rapport au genre *Bacillus* (>30%) dans le lait frais et pasteurisé (Fromm et Boor, 2004, Durak *et al.* 2006, Huck *et al.* 2007, Ranieri et Boor 2010, Ivy *et al.* 2012). Cette nouvelle répartition est notamment due à l'évolution des techniques d'identification qui ont permis de différencier les 2 genres qui ne le sont pas ou très difficilement par les méthodes phénotypiques. Cependant, dans le genre *Bacillus*, les espèces *B. licheniformis* et *B. subtilis* observées dans le lait frais restent très majoritaires pour les espèces mésophiles tandis que pour les espèces psychrophiles le groupe *B. cereus* est prédominant (*B. cereus*, *Bacillus weihenstephanensis/mycoïdes*). Pour le genre *Paenibacillus*, l'espèce *Paenibacillus odorifer* est très majoritaire dans cette étude suivie de *Paenibacillus amylolyticus* (respectivement 62 et 25% des isolats du genre). Dans cette répartition des genres et espèces dans le produit fini, Ranieri et Boor (2009) ont mis en évidence une évolution au sein des germes présents au cours de la durée de vie microbiologique du produit. De la première journée jusqu'à 17 jours de conservation, ce sont les *Bacillus* qui sont majoritaires puis les *Paenibacillus* les supplantent jusqu'à la fin de la DLC.

Si l'on tient compte du procédé complet pour les 2 genres *Paenibacillus* et *Bacillus*, la relation entre la contamination du lait frais et la flore du lait pasteurisé a été prouvée par l'analyse d'allèles communs entre isolats provenant des 2 extrémités du process (Huck *et al.* 2007). Pour Scheldeman (2005), qui a étudié la diversité des spores aérobies HHRS directement dans 17 fermes de lait belges, ce sont 7 genres qui ont été identifiés sur 700 isolats aérobies. *B. licheniformis* et *G. pallidus* sont les espèces majoritaires, grâce à un potentiel de résistance au traitement thermique important.

### 3.5.3.3. Le lait stérilisé : le lait stable à température ambiante

Dans le lait stérilisé dit UHT (Ultra High Temperature pour très haute température), les espèces responsables d'altération du produit fini stable à température ambiante sont différentes du fait de l'application d'un traitement thermique plus intense (130°C pendant 4s). En 1979, Id et Schaal ont publié une étude sur l'occurrence des germes présents dans 3 types de lait UHT altérés ou non. Les spores aérobies avaient l'occurrence la plus élevée alors que les spores anaérobies étaient rares. Et même si *B. coagulans* (Gilmour et Rowe 1990) ou *G. stearothermophilus* (Kalogridou-Vassiliadou 1992, Rombaut *et al.* 2002) ont été isolés de ce type de produit, ces dernières années ont vu plusieurs équipes travailler tout spécifiquement sur *Bacillus sporothermodurans* (Pettersson *et al.* 1996, Huemer *et al.* 1998,

Scheldeman *et al.* 2006, van Zuijlen *et al.* 2010, Aouadhi *et al.* 2014). L'une des explications du fort impact de cette espèce dans cet environnement est le traitement thermique appliqué qui a détruit toutes les autres flores présentes dans le lait frais. Il n'y a alors plus de compétition pour cette espèce plus résistante, qui peut alors se développer et dégrader le produit (Scheldeman *et al.* 2006). Si la présence de *G. stearothermophilus* est attendue suite à un traitement UHT, cette espèce faisant partie des spores hautement résistantes, celle de *B. sporothermodurans* était plus inattendue au départ. Mais Huemer *et al.* (1998) puis Scheldeman (2006) ou van Zuijlen 2010 ont confirmé que cette espèce faisait bien partie du groupe de HHRS avec une valeur de D à 140°C pouvant atteindre 5 secondes. Par contre, l'identification précise de l'origine de cette espèce est pour l'instant difficile à établir étant donné qu'elle n'a été détectée que dans le produit fini qu'est le lait UHT (Scheldeman *et al.* 2006). Tout dernièrement, Aouadhi *et al.* (2014) ont voulu étudié l'impact de la nisine dans le lait et des produits plus complexes comme un lait chocolaté. Et dans le cas où l'utilisation de la nisine serait légale, l'efficacité a été assez faible du fait d'un effet protecteur du lait vis-à-vis de celle-ci.

#### 3.5.3.4. *Le lait déshydraté : la poudre de lait*

Dans les poudres de lait, les flores étudiées sont aussi exclusivement aérobies. La poudre de lait est principalement considérée comme vecteur car lorsqu'elle est utilisée, elle apporte une contamination ayant un pouvoir altérant dans le produit final lorsque les spores peuvent germer (Chopra *et al.* 1984, Chen *et al.* 2004). *G. stearothermophilus* est alors responsable d'une dégradation appelée « flat sour » (Kalogridou-Vassiliadou 1992).

Dans une étude menée dans 18 pays, Rueckert *et al.* (2004) ont défini que *G. stearothermophilus* et *Paenibacillus flavithermus* étaient les flores les plus fréquentes ; prépondérance confirmée par Scott *et al.* (2007) et, plus récemment, par Yuan *et al.* (2012). Ces derniers auteurs ont étudié la distribution de ces spores thermophiles dans des poudres de lait infantiles en Chine. A *G. stearothermophilus* et *P. flavithermus*, ils ont ajouté *B. licheniformis* qui, à eux trois, représentaient plus de 80% des isolats. *B. licheniformis* était le plus fréquent dans des échantillons où la contamination en spores était majoritairement inférieure à  $10^3$  ufc.g<sup>-1</sup> et exceptionnellement à  $10^4$  ufc.g<sup>-1</sup>. Pour Murphy *et al.* (1999), ce sont *G. stearothermophilus* et *B. licheniformis* qui sont majoritaires dans le lait pour les flores thermophiles et avec des concentrations entre 30 et 300 ufc.ml<sup>-1</sup>. Par contre, dans l'étude de Reginensi *et al.* (2011), *G. stearothermophilus* n'a même pas été identifié. D'autres études ont



identifié *B. subtilis* ou *B. pumilus* comme majoritaires dans ces produits (Bienvenue 1999, Jimenez-Flores 1999).

Cette flore thermophile est aussi un bon indicateur d'hygiène des produits finis. Lorsqu'elle est présente à plus de  $10^4$  spores.g<sup>-1</sup> de poudre de lait, l'hygiène du procédé peut être mise en cause (Burgess *et al.* 2010) notamment car les espèces thermophiles sont plutôt en faible quantité dans le lait frais (<10 spores.g<sup>-1</sup>) et qu'elles augmentent au cours du procédé (Hill et Smythe 1994, Mc Guiggan 2002, Rominus *et al.* 2003, Scott *et al.* 2007). Scott *et al.* (2007), qui ont échantillonné tout au long de la ligne de production, ont mis en évidence 2 zones de prolifération particulières : l'échangeur à plaque pour le préchauffage et l'évaporateur. Dès l'étape du préchauffage, la quantité de spores thermophiles peut augmenter de 1 à 4 logs puis atteindre un maximum dans l'évaporateur pour se maintenir ou diminuer selon le procédé final. L'évaporateur a été identifié par Murphy *et al.* (1999) comme zone de prolifération des bactéries sporulantes thermophiles qui est en plus favorisée par l'étape de préchauffage.

Dans quelques articles, il est aussi fait mention d'une flore très différente, anaérobie et mésophile, mais qui a un impact sanitaire sur les enfants en bas âge mais non pas altérant, raison de son absence dans cette bibliographie. Néanmoins, il a paru intéressant de citer le genre *Clostridium* dans cette matrice qu'est la poudre de lait car il donne des résultats complètement opposés à la fois par les espèces isolées que par l'impact de ce genre sur la qualité des produits (Brett *et al.*, 2005, Barash *et al.*, 2010)

#### 3.5.3.5. *Le lait fermenté : les fromages*

Dans les fromages, ce sont uniquement des bactéries sporulantes strictement anaérobies, au contraire des produits discutés précédemment, qui sont responsables d'altération par une production de gaz importante. Ce sont toutes des espèces du genre *Clostridium* du groupe phylogénétique I (Collins *et al.*, 1994) qui sont responsables de ces altérations dites du gonflement tardif pouvant aller jusqu'à l'éclatement des fromages majoritairement à pâte cuite (Comté, Emmental, Beaufort, Gouda..., Goudkov et Sharpe, 1966). Le défaut provient de la dégradation du lactate par les bactéries qui, par fermentation butyrique (Dasgupta et Hull 1989), produisent deux gaz (CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>) et de l'acide butyrique générant une dénaturation du goût (goût rance, Innocente et Corradini 1996). De ce fait, l'utilisation de l'analyse de composés volatiles tel que l'acide butyrique peut être utilisée pour détecter des fermentations anormales lors de la fabrication de fromages (Chavarri *et al.* 1997; Innocente *et al.* 2000). De très nombreuses études ont été menées sur la caractérisation des flores d'altération. Et seules 4

espèces sont très majoritairement à l'origine de ce défaut : *Clostridium beijerinckii*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes*, *C. tyrobutyricum* (Matteuzzi *et al.* 1972, Dasgupta *et al.* 1989, Cocolin *et al.* 2004, Le Bourhis *et al.* 2005, Garde *et al.* 2011, Cremonesi *et al.* 2012, Garde *et al.* 2012, Bassi *et al.* 2013). Ponctuellement, *Clostridium cochlearium* a aussi été isolé (Lycken et Borch 2006). L'association de leur capacité à résister au traitement de pasteurisation du lait grâce à la forme sporulante, avec celle à se développer dans le produit permet à ces espèces de dégrader les fromages (Guericke 1993, Ingham *et al.* 1998, Cocolin *et al.* 2004, le Bourhis *et al.* 2005). Ces accidents se manifestent à partir d'un nombre limité de spores (200 spores.l<sup>-1</sup> de lait), deviennent fréquents au-dessus de 400 spores.l<sup>-1</sup> et généralisés à plus de 1000 spores.l<sup>-1</sup> (Bergère *et al.* 1968)

Les espèces majoritaires ayant été bien identifiées, des méthodes basées sur la biologie moléculaire telle que la PCR ont été développées pour détecter plus rapidement sur la ligne ou dans les produits les 4 espèces majoritaires en multiplex (*C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* ; Cremonesi *et al.* 2012) ou mono espèce (*C. tyrobutyricum* ; Bassi *et al.* 2013).

#### 3.5.4. Les conserves et les germes les plus thermorésistants

La production des conserves est un procédé simple qui correspond à plusieurs types de conserves selon le pH du produit fini, puisque les germes capables de se développer dans la conserve ne sont pas les mêmes selon le pH du produit. Cela a conduit les industriels à adapter les process notamment en fonction de la résistance thermique des germes à maîtriser. La première limite en partant d'un pH neutre, est le pH de 4,6 (international : FDA 2014) ou 4,5 (français : arrêté de 1955). Au-dessus de ce pH, les conserves sont considérées non acides et le risque botulique n'est pas considéré comme maîtrisé s'il n'y a pas un traitement de stérilisation supérieur à 100°C et que celui-ci n'atteint pas une valeur stérilisatrice (calculé à 121,1°C et un z de 10°C) minimale de 3 min dans la majorité des conserves (temps nécessaire pour détruire 12 D de *C. botulinum*). En dessous de ce pH, les conserves sont dites acides et un traitement de pasteurisation peut être suffisant, la valeur pasteurisatrice étant calculée à 93,3°C avec un z de 8,89°C. Cependant, un classement secondaire peut être défini avec les conserves moyennement acides jusqu'à un pH de 3,8 où quelques rares espèces sporulantes acidotolérantes peuvent encore se développer. En dessous, les conserves sont dites très acides et un seul genre acidophile et sporulé est responsable d'altération.



#### 3.5.4.1. *Les conserves très acides*

Ces conserves très acides proviennent de la filière du fruit transformé en jus et autres concentrés. Le pH de ces produits se situe généralement aux alentours de 3,5 mais certains fruits comme le cassis donnent des pH de 2,5. A ces pH, le seul genre sporulé capable de se développer est le genre *Alicyclobacillus*. Le genre a été caractérisé par Wisotzkey *et al.* en 1992. Depuis 1967, ce germe thermophile capable de se développer à des faibles pH avait été décrit au Japon (Walker et Phillips, 2008). Les premiers cas liant une altération d'un jus de fruits, de la pomme, à *Bacillus acidoterrestris* datent de 1987 (Deinhard *et al.* 1987) ou à *Bacillus acidocaldarius* en 1984 (Cerny *et al.*).

Depuis cette époque, de nombreux auteurs ont identifié *Alicyclobacillus spp.* comme responsable de l'altération de conserves acides de jus et concentrés de mangue (Gouws *et al.* 2005), de jus de pommes (Splittstoesser *et al.* 1994, Previdi *et al.* 1995, Walls et Chuyate 1998, Lusardi *et al.* 2000, Chen *et al.* 2006) de jus d'oranges ou de fruits tropicaux (Previdi *et al.* 1995) ou du jus d'oranges (Eiroa *et al.* 1999).

Dans le genre *Alicyclobacillus*, certaines souches ont un pouvoir d'altération plus important car elles sont capables de produire du gäïacol en grande quantité (Lusardi *et al.* 2000, Walls et Chuyate 2000, Lin *et al.* 2005). Cette molécule, même à une très faible concentration de 2 ppb, altère l'odeur du produit (Danyluk *et al.* 2011). D'autres composés incluant le 2,6 dichlorophénol et le 2,6 dibromophénol ont pu être aussi associés à une dégradation du produit fini (Danyluk *et al.* 2011). Un léger trouble du jus peut aussi être détecté (Chen *et al.* 2006).

A l'aide de ces nombreux isollements provenant des produits altérés, Silva *et al.* (2011) ont défini le genre *Alicyclobacillus*, et plus particulièrement l'espèce *Alicyclobacillus acidoterrestris* comme le germe de référence des jus de fruits pasteurisés. Vu l'importance de ce genre *Alicyclobacillus*, plusieurs études ont été conduites dans le but de caractériser l'occurrence du genre observé mondialement.

Dans le jus de pomme, Walls et Chuyate (1998) ont détecté une saisonnalité dans l'altération des jus avec un maximum lorsque les productions avaient lieu au printemps et en été ; dans cette étude, 35% des altérations de jus étaient dues à *Alicyclobacillus*. Lors d'une étude sur le jus d'oranges, 11 échantillons sur 75 ont été détectés comme contaminés par le même genre (Eiroa *et al.* 1999) ; une occurrence de 6,1% des concentrés de jus de fruits tropicaux analysés contenait *Alicyclobacillus* dont 81% de l'espèce *A. acidoterrestris* et 19% d'*Alicyclobacillus*

*acidocaldarius* (Danyluk *et al.* 2011). Lorsque le produit était analysé ainsi que la ligne de production, *A. acidoterrestris* était isolé très majoritairement par rapport à *A. acidocaldarius* aussi bien dans des concentrés de fruits, dans les eaux de lavage des fruits que dans les sols (Groenewald *et al.* 2009, Chen *et al.* 2006). Plus tôt, Wisse et Parish (1998) avaient mis en évidence la présence de bactéries sporulantes acidophiles dans tout l'environnement de la production de jus d'oranges (sol, surface des fruits lavés ou non et cuve de stockage des concentrés).

Suite à la découverte des espèces altérant les jus de fruits dans les années 1990, de nombreuses équipes ont travaillé sur la mise au point de méthodes simples pour les détecter. Plusieurs articles ont été publiés pour identifier les milieux ou les méthodes les plus performantes. Walls et Chuyate (2000) identifient la gélose K comme le milieu le plus performant, puis Murray *et al.* (2007) ont comparé 10 milieux et plusieurs couples temps-température pour l'incubation. Dans l'étude de Mc Namara *et al.* (2011), la filtration est apparue comme la méthode la plus performante vis-à-vis de l'inoculation dans la masse et en surface. En 2013, un nouveau milieu chromogénique a été testé afin d'isoler spécifiquement l'espèce *A. acidoterrestris* (Uchida *et al.* 2013) car pour les laboratoires d'analyse, ce type d'analyse est le plus courant et le moins cher. De temps en temps, des techniques moins communes sont développées. Pour Lin *et al.* (2005), la spectrométrie par infrarouge a été utilisée dans le but de différencier les isolats d'*A. acidoterrestris* productrices de gäiäcol et les autres. Cette méthode avait pour but de détecter rapidement la présence de l'espèce altérante mais aussi de qualifier les souches présentes pour leur pouvoir d'altération.

#### 3.5.4.2. *Les conserves moyennement acides*

Dans les conserves où le pH n'est pas aussi bas, certains germes apparaissent petit à petit lorsque le pH des matrices remonte au-dessus de 3,8 grâce à un pH minimum de croissance bas. Il y a tout d'abord les conserves de fruits, telles que les pêches ou les poires au sirop, ou de tomates. Dans ce dernier type de produit a été isolée, dès 1939 par Townsend, l'espèce *Clostridium pasteurianum*. Deligaris *et al.* (1996) ont isolé différentes clostridies d'eaux de process d'une ligne de conserves de pêche. Et si *C. sporogenes* et surtout *B. beijerinckii* ont été isolées, cette dernière espèce représentant 84% des isolats, c'est bien *C. pasteurianum* qui correspondait au risque le plus important avec sa limite de pH de croissance à 3,8-3,9. La spécificité de *C. pasteurianum* a été confirmée plus récemment par Bocchi et Previdi (2004). Dans leur étude, ils ont isolé 4 espèces de *Clostridium* de différentes conserves : *C. pasteurianum* (de pêches ou de poires), *C. tyrobutyricum* de tomates et *C. beijerinckii* de

champignons acidifiés. Seul *C. pasteurianum* a présenté la capacité de germer à des pH inférieurs à 4,2. La limite basse de pH observée par cette équipe a été de 3,5 dans une purée de pêche. Plusieurs auteurs ont aussi isolé cette espèce, à partir de matrices acides comme des jus d'oranges ou de pommes (Ikegami *et al.* 1970, Feng *et al.* 2010). Malheureusement, peu d'études se sont focalisées sur l'écologie de cette espèce dans l'environnement de production. Mais les quelques études, notamment sur la résistance thermique de ce germe, confirment l'importance de cette espèce dans les conserves avec un pH compris entre 3,7 et 4,2 (Magalhaes *et al.* 1997, Bocchi et Previdi 2004, Feng *et al.* 2010).

Parallèlement à ces études, et ponctuellement, certains auteurs ont pu identifier des souches particulièrement acidotolérantes. C'est le cas d'Everis et Betts (2001) qui ont travaillé avec des conserves faiblement acides et qui ont défini pour les isolats des espèces *Paenibacillus polymyxa* et *C. tyrobutyricum* des pH limites de croissance de 4,3. Une étude s'est particulièrement intéressée à *B. licheniformis* dans les conserves familiales de tomates aux Etats-Unis d'Amérique (Fields *et al.* 1977). L'intérêt dans cette étude n'est pas l'altération due aux *Bacillus* qui posent problème mais la capacité des germes altérants à faire remonter le pH, ce qui annihile la perte d'inhibition de *C. botulinum* qui a lui, un impact sanitaire très important. Cependant, l'espèce *Bacillus coagulans* reste la plus souvent identifiée comme responsable d'altération de conserves moyennement acides telles que les tomates pasteurisées avec une capacité de croissance jusqu'à un pH de 4,2-4,3 (York *et al.* 1975, Sandoval *et al.* 1992, Palop *et al.* 1999). Au CTCPA, l'espèce *B. coagulans* est la seule espèce que nous avons identifiée comme responsable de l'altération de conserves naturellement acides ou acidifiées à un pH de 4,3. Cette espèce est très majoritaire dans les aliments avec des pH compris entre 4,4 et 5 (données personnelles). Cette espèce n'a été clairement définie que par Gordon *et al.* (1973) suite aux premiers isolements par Berry (1933) de l'espèce *B. thermoacidurans* d'une conserve altérée de tomates ou par Hammer (1915) dans de la poudre de lait coagulée. De même, de nombreux synonymes ont été utilisés (*Bacillus dextralacticus* (Andersen et Werkman 1940), *Bacillus thermoacidificans* (Renco 1942), *Lactobacillus cereale* (Olsen 1944)). Encore aujourd'hui *B. coagulans* est utilisé sous un autre nom dans le domaine des compléments alimentaires : *Lactobacillus sporogenes*, bien connu comme probiotique. De cette espèce, peu de données d'écologie sont disponibles car le pH et le traitement thermique peuvent être suffisants pour maîtriser ce contaminant. De ce fait, de nombreuses études ont été effectuées sur l'impact du pH sur la résistance thermique de cette espèce (Nakajyo et Ishizu 1985, Sandoval *et al.* 1992, Palop *et al.* 1997, Peng *et al.* 2012). Il

faut noter, que de nouveau pour un produit de conserve, aucune étude écologique n'a été effectuée spécifiquement pour cette espèce.

#### 3.5.4.3. *Les conserves non acides*

Ce domaine de l'agroalimentaire est à la fois la spécialité du laboratoire comme l'objet même d'un des articles présentés dans cette thèse (Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey (2013)). En résumé, il existe peu d'études sur les germes responsables de la non-stabilité des conserves non acides, à l'exception de celles sur *C. botulinum*. Quelques études datent de plus de 20 ans, date à laquelle les nouvelles technologies telle que la biologie moléculaire n'étaient pas utilisées couramment pour les identifications. Depuis, seules quelques études spécifiques, soit d'un genre ou d'une espèce soit d'un produit, ont été publiées. Il en ressort que *G. stearothermophilus* a été isolé de nombreuses conserves altérées suite à une incubation à 55°C et que plusieurs espèces de *Bacillus* ou de *Paenibacillus* comme *B. coagulans*, *B. licheniformis* ou *Paenibacillus macerans* sont relativement fréquentes. Pour les germes anaérobies, les genres *Thermoanaerobacterium*, *Desulfotomaculum* voire *Moorella* ont été ponctuellement isolés de conserves non stables à 55°C.

#### 3.5.5. Tableau récapitulatif

Pour conclure cette revue bibliographique des germes sporulants d'altération dans le domaine de l'agroalimentaire, il a été constitué un tableau regroupant les principales espèces isolées de chaque groupe de produits avec un résumé des principales caractéristiques physiologiques : température et pH de croissance, thermorésistance (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Principales espèces bactériennes sporulantes selon les différents types de produits alimentaires et leurs principales caractéristiques physiologiques

Matrice	Espèce	Température de croissance Références	Résistance thermique Références
Produits de panification	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	15°C à 50°C opt. 30-40°C	2,5 min à 110°C, z=12,8°C 2,1 min à 115°C, z=7,4°C
		Priest <i>et al.</i> 1987	Kim <i>et al.</i> 2005 données personnelles
Produits carnés pasteurisés réfrigérés	<i>Clostridium algidicarnis</i>	>4 à 37°C, opt 25-30°C	230 min à 90°C, z=10,5°C 5 min à 95°C
		Lawson <i>et al.</i> 1994	Broda <i>et al.</i> 2009 Données personnelles
	<i>Clostridium putrefaciens</i>	<5 à 30°C opt 15-25°C <0°C - <37°C	14 min à 80°C
		De Vos <i>et al.</i> 2009 Sturges <i>et al.</i> 1927	Roberts et Derrick 1975
	<i>Clostridium estertheticum</i>	1°C à 15°C	48s à 100°C
		Collins 1992	Broda <i>et al.</i> 2007
<i>Clostridium gasigenes</i>	-1,5 à 26°C, opt 20-22°C	Aucune valeur disponible	
	Broda <i>et al.</i> 2000		
Produits laitiers pasteurisés	<i>Bacillus Paenibacillus</i>	Pas d'espèce type	
Produits laitiers stérilisés	<i>Bacillus sporothermodurans</i>	0 à 50°C	D140°C=6s
		Petterson 1996	Huemer <i>et al.</i> 1998
Produits laitiers déshydratés	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	40 à 70°C, pH mini 5,0	3 min à 121°C, z= 9.1 °C T5D entre <0,5min et 12,1 min à 120°C
		Durand <i>et al.</i> 2014	Rigaux <i>et al.</i> 2013 Durand <i>et al.</i> 2014
	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	43 à 62°C, opt 57°C	2 min à 110°C, z=13°C
		Zhao <i>et al.</i> 2013	Zhao <i>et al.</i> 2013

Tableau 2 (suite) : Principales espèces bactériennes sporulantes selon les différents types de produits alimentaires et leurs principales caractéristiques physiologiques.

Matrice	Espèce	Température de croissance	Résistance thermique
		Références	Références
Produits laitiers fermentés	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	<25 à 45°C opt 30-37°C 10°C> 12-15°C à 40.2-43.3°C.	0,053 min à 120°C, z=14,5°C
		De Vos <i>et al.</i> 2009 Ruusunen <i>et al.</i> 2012	Toyoda <i>et al.</i> 1990
	<i>Clostridium butyricum</i>	8-11°C - ND 10°C - ND opt 30-37°C	0,045 min à 120°C, z=11,7°C 4,7 min 100°C
		Ghoddusi <i>et al.</i> 2013 De Vos <i>et al.</i> 2009	Toyoda <i>et al.</i> 1990 Morton <i>et al.</i> 1990
	<i>Clostridium sporogenes</i>	<25 à >45°C, opt 30-40°C <11°C-ND	1,28 min à 121°C, z=11,1°C 0,8 à 2,2 min à 105°C, z=6,6 et 7,8°C
De Vos <i>et al.</i> 2009 Whiting <i>et al.</i> 1985		Diao <i>et al.</i> 2014 André <i>et al.</i> 2013	
<i>Clostridium beijerinckii</i>	25 à 45°C opt 37°C		
	Keis <i>et al.</i> 2001		
Conserves très acides	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	<35°C- >55°C opt. 42-53°C pH 2.2-5.8 25°C-60°C	1.7 min à 95°C, z=7.6°C 2.3 min à 102°C
		Deinhard <i>et al.</i> 1987 Silva et Gibbs 2001	Bevilacqua et Corbo 2011 Luera Pena <i>et al.</i> 2009
Conserves acides	<i>Clostridium pasteurianum</i>	pH limite : 3,5 ou 4,3	1,9 à 4,31 à 100°C, z= 5,05 à 10,8 dans matrice 4,4 à 90°C, z=11°C 13,6 min à 90°C, 3,8 min à 95°C
		Previdi et Brocchi 2004 ou Feng <i>et al.</i> 2010 et données personnelles	Bocchi et Previdi 2004 Feng <i>et al.</i> 2010 données personnelles
	<i>Bacillus coagulans</i>	<30 à < 61°C, opt 40-57°C, pH limite 4.0 30°C à 55°C	1.1 à 92,3 min à 110°C, z= 6,8 à 9,6°C 0,05 à 38,6 min à 110°C, z=8,3 et 5,7°C
De Vos <i>et al.</i> 2009 Marshall et Beers 1967		Nakajo et Moriyama 1991 Données personnelles	
Conserves non acides	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	40 à 70°C, pH mini 5,0	3 min à 121°C, z= 9.1 °C T5D entre <0,5min et 12,1 min à 120°C
		Durand <i>et al.</i> 2014	Rigaux <i>et al.</i> 2013 Durand <i>et al.</i> 2014

Les données de thermorésistance comme de croissance sont données à titre indicatif, car seules quelques données sont reportées. Une méta-analyse telle que celle menée par Rigaux *et al.* (2013) sur *Geobacillus stearothermophilus* ou Diao *et al.* (2014) avec *C. sporogenes* ou *C. botulinum* permette d'obtenir une valeur robuste non dépendante d'une étude ou de tous les paramètres associés. Dans le cas où une seule donnée est présentée, celle-ci est à prendre avec précaution car elle n'a pu être comparée à une autre donnée.

## 4 - MATERIEL ET METHODES

---

Dans ce chapitre est présenté la majorité des protocoles communs utilisés dans les différentes études reportées dans ce manuscrit (paragraphe 4.1 à 4.7). Le dernier paragraphe (4.8) correspond à une méthodologie originale publiée et mise au point au cours de cette thèse.

#### 4.1. Echantillonnage

Une collection d'isolats sans précédent issus de contaminants de conserverie a pu être constituée lors de plusieurs études menées grâce à la collaboration d'industriels de la conserve. Nous nous sommes intéressés successivement (i) à la caractérisation de la diversité de la flore contaminant les conserves, (ii) à la comparaison de cette flore avec celle contaminant les matières premières et finalement (iii) à la caractérisation de la contamination au niveau des différentes étapes d'une chaîne de production. Pour ce faire,

- pour l'étude sur la caractérisation de la flore responsable de non stabilité à 55°C, les industriels ont envoyé pendant 10 ans des échantillons de produits finis naturellement contaminés (455 échantillons au total). En plus d'être représentatifs d'une longue période de production et d'une large gamme de recettes, les échantillons ont aussi été prélevés au sein de la production française auprès de plus de 120 industriels participants établis dans toute la France et correspondant à toutes les tailles d'entreprises (de l'artisan à la multinationale).
- Dans le cadre de l'analyse des contaminations de matières premières (carottes et haricots verts), plusieurs usines réparties dans tous les bassins de production français ont été partenaires pour envoyer des échantillons prélevés au cours d'une campagne de production.
- En ce qui concerne la détermination de la contamination en différents points d'un processus de mise en conserves de haricots verts, deux usines ont prélevé des échantillons aux cours de 2 campagnes. Pour la première année, 5 points de prélèvements ont été définis à la fréquence de 3 échantillons par jour, 5 jours par semaine et pendant 7 semaines (235 échantillons). Lors de la deuxième année, une deuxième usine a été choisie pour maximiser la variabilité des prélèvements. Par contre, comme les variations de concentration étaient faibles ou lentes, quelques points supplémentaires ont été ajoutés afin de pouvoir affiner le modèle. Cela a conduit au prélèvement de 155 échantillons répartis en 7 points de prélèvements, 1 ou 3 fois par jour, 3 jours par semaine et pendant 5 semaines.



## 4.2. Matériel biologique, culture et dénombrement

### 4.2.1. Matériel biologique

La très grande majorité des isolats utilisés dans l'ensemble des études présentées dans ce manuscrit proviennent de l'analyse d'un grand nombre d'échantillons de conserves altérées et ont été mis en collection au CTCPA. Le but de cette collection est d'avoir à disposition un grand nombre et une grande variété d'espèces de bactéries sporulantes mais aussi de pouvoir travailler avec des isolats provenant d'un environnement industriel, donc plus à même de posséder des caractéristiques physiologiques particulières par rapport aux souches types issues de collections de référence (ATCC, DSMZ, ...). Certaines souches types ont cependant été utilisées afin de pouvoir les comparer ou tout simplement augmenter l'éventail d'espèces étudiées si elles n'avaient pas été isolées d'échantillons industriels. Les espèces les plus utilisées correspondent aux espèces responsables d'altération des conserves (par ordre de fréquence décroissant) : *Moorella thermoacetica/thermoautotrophica*, *G. stearothermophilus*, *Thermoanaerobacterium* sp. (Article 2 de cette thèse), *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. smithii*, *C. sporogenes*, *C. novyi*, *Paenibacillus* sp, *P. macerans* et *P. polymyxa* (données personnelles).

### 4.2.2. Méthodes de culture

Toutes les espèces bactériennes ont été cultivées selon un protocole éprouvé au laboratoire permettant justement la culture des différents genres bactériens utilisés ou étudiés au laboratoire. Pour cela, le bouillon Rosenow (Biorad, France) a été utilisé pour les flores aérobies et le bouillon Rosenow enrichi avec marbre et cervelle et désaéré a été privilégié pour les flores anaérobies strictes. Lors d'isolement, les géloses au BromoCrésol Pourpre (BCP) ou à la Viande Foie Réducteur (VFSR) enrichi d'amidon ont été utilisées respectivement pour les flores aérobies et anaérobies. Toutes les flores mésophiles ont été incubées 2 jours à 37°C comme pour la flore aérobie thermophile à 55°C. Pour la flore anaérobie thermophile, l'incubation se prolongeait jusqu'à 5 jours à 55°C.

### 4.2.3. Méthodes de dénombrement

Pour le dénombrement des flores sporulantes au laboratoire, une méthode interne a été publiée en tant que norme Afnor (NF V 08-602, 2011) à la demande des industriels afin que tous les intervenants de la filière de la conserve puissent comparer leurs résultats à l'aide d'une seule

et même méthode de dénombrement utilisée quotidiennement. En résumé, un traitement thermique de 10 min à 100°C est effectué pour éliminer les formes végétatives et activer les formes sporulantes puis les dilutions au dixième sont réparties soit dans la gélose BCP soit la gélose VFSRm (VFSR modifié avec ajout de 2 g.l<sup>-1</sup> d'extrait de levure).

#### **4.3. Production des spores**

Toutes les suspensions de spores ont été obtenues par la même méthodologie sur une gélose de sporulation comme indiqué dans la norme NF T 72-231 (Afnor, 1988). Les différences de protocole selon les espèces proviennent de la physiologie des espèces elles-mêmes. Par exemple, si le germe est aérobic ou anaérobic, les géloses sont différentes et de même, selon la vitesse de sporulation, le temps d'incubation peut varier de 2 jours à plus de 3 semaines.

#### **4.4. Analyse des conserves**

Lorsque des échantillons industriels altérés étaient réceptionnés au laboratoire, une méthode éprouvée pour permettre la croissance d'une majorité d'espèces rencontrées dans les conserves a été préférentiellement utilisée. Celle-ci provient du guide sur les défauts et altération des conserves publié en 1982 (Bouvier *et al.*). Avant cela, la non stabilité de conserves a été constatée à l'aide d'une des deux normes françaises explicitées précédemment (NF V 08-401 ou NF V 08-408, Cf. paragraphe 2.2.).

#### **4.5. Détermination des paramètres de thermorésistance**

Les spores se caractérisant par leur capacité à résister à des stress environnementaux, il est apparu primordial de caractériser la résistance à la chaleur, la thermorésistance, dans le cadre de l'amélioration des connaissances sur les germes résistant au traitement thermique. Au niveau de la détermination des paramètres de thermorésistance, si dans les premières années les tubes TDT (Thermal Death Time) ont été privilégiés, dès que le personnel a été formé à l'utilisation des capillaires en verre, toutes les thermorésistances ont été mesurées avec cette méthode moins consommatrice de spores, de temps et plus simple à mettre en place. Quelques règles ont été définies au laboratoire dans le but d'obtenir des résultats les plus robustes possibles pour la détermination des paramètres de thermorésistance (D et z, Cf. paragraphe 3.5.3.) :

- un D ne peut être obtenu avec moins de 3 logs de destruction, 5 logs étant plus confortable,

- le  $r^2$  d'un D ne doit pas être inférieur à 0,96,
- pour obtenir un D, un minimum de 12 points doit être prévu,
- pour obtenir un z, 5 D doivent être utilisés et ceux-ci doivent couvrir une plage de valeurs de plus d'un log,
- le  $r^2$  d'un z ne doit pas être inférieur à 0,98.

Au niveau des modèles pour caractériser la thermorésistance, si le modèle de Bigelow (paramètre D, destruction log linéaire) est préférentiellement utilisé pour transmettre les résultats aux industriels, car bien connu et maîtrisé, le modèle de Weibull est privilégié lors de l'analyse de l'effet d'un facteur car il permet une modélisation plus réaliste de la destruction lorsqu'elle ne suit pas un mode log-linéaire grâce à ses 2 paramètres ( $\delta$  et  $p$ ).

#### 4.6. Modélisation des populations

Dans l'article sur l'évaluation du risque d'altération dans les conserves de légumes, une approche probabiliste a été privilégiée. Dans ce cas, les distributions de l'incertitude et de la variabilité sont modélisées et déterminées à l'aide de tirages aléatoires pour chaque paramètre. Cela a aussi permis de simuler de nombreux scénarios.

Pour cela, la simulation de Monte Carlo 2D avec le logiciel R a simulé 4,5 millions de boîtes avec  $N_u = 1500$  et  $N_v = 3000$  ( $N_u$  = uncertainty dimension,  $N_v$  : variability dimension). Dans un premier temps, il a été déterminé les étapes influençant significativement l'évolution de la contamination. Par la suite, l'analyse de sensibilité, à l'aide des indices de Sobol (totaux et d'ordre 1), a permis de mettre en évidence l'influence de la variation des paramètres étudiés sur l'évolution de la concentration en spores du produit fini. Enfin les tests de scénarios utilisés ont eu pour but de définir des moyens de maîtrise possibles ou de déterminer l'influence de certaines hypothèses du modèle sur le résultat final. Et dans le contexte plus général de la modélisation globale risque-bénéfice, le modèle global a été représenté par un réseau bayésien.

#### 4.7. Identification par biologie moléculaire

##### 4.7.1. Préparation des échantillons

L'ADN bactérien a été extrait à partir de colonies isolées sur milieu de culture solide ou après centrifugation de culture. Pour l'extraction d'ADN, le kit InstaGene (Biorad) a été utilisé selon les recommandations du fabricant. L'ADN bactérien a aussi pu être extrait directement

à partir de la matrice alimentaire en utilisant le kit Archive pure (5Prime). Dans tous les cas, l'ADN a été au final solubilisé dans de l'eau stérile puis congelé à -20°C.

#### 4.7.2. Identification des espèces

Pour déterminer l'espèce d'appartenance d'un isolat, 2 méthodes en biologie moléculaire ont été utilisées. Dans le cas où l'espèce à identifier était présumée, grâce à un certain nombre d'information comme les caractéristiques de l'altération, l'occurrence de celle-ci dans la matrice analysée ou le type de colonies sur gélose, l'espèce était détectée par une PCR spécifique (SporeTraQ™) permettant la révélation d'une bande spécifique. Le développement de cette méthode a fait l'objet de l'article présenté ci-dessous (article 1).

Dans le cas où l'espèce n'était à priori pas prévisible, ou bien si elle ne faisait pas partie des espèces tracées par le SporeTraQ™, alors un séquençage partiel de l'ADNr 16S était effectué. Après une PCR réalisée avec des amorces FD1 et RD1 selon Weisburg *et al.* (1991), le séquençage a été réalisé par Eurofins MWG opéron (Ebersberg, Allemagne) selon la méthode de Sanger (Sanger et Coulson, 1975) avec les amorces S6-16 s et/ou FD1. A la réception des séquences, une comparaison de séquences était effectuée sur la bases de données de séquences de nucléotides (GenBank à NCBI) à l'aide de MEGABLAST avec logiciel RDP (Cole *et al.* 2009).

#### 4.8. Développement d'un outil d'identification rapide des bactéries sporulantes d'intérêt (article 1)

##### Contexte

Pour identifier une bactérie, et particulièrement les flores végétatives pathogènes et d'altération, il est utilisé depuis toujours les caractéristiques biochimiques des germes. Cette méthode a donc été utilisée au début du programme d'identification des germes responsables des cas d'altération de conserves mené au CTCPA, notamment à l'aide de la galerie 50CH spécifiquement développée pour les germes sporulants. Mais rapidement, du fait de nombreuses identifications peu pertinentes, il a été décidé de passer par des outils de biologie moléculaire connus pour être plus précis. De manière très courante, le séquençage d'une partie de l'ADNr 16S a alors été utilisé pour identifier le genre et l'espèce des bactéries. Cette méthodologie a donc été utilisée au CTCPA. Mais le séquençage de l'ADN amplifié ne pouvant être effectué au laboratoire, le délai pour obtenir une identification était relativement

long. Or, pour les conserves de légumes, les campagnes de production peuvent ne durer que 6 à 8 semaines. Dans le but d'identifier plus rapidement les principaux germes responsables des non stabilités (Cf. paragraphe 5.1.1.) mais aussi de pouvoir les détecter au milieu d'une flore abondante dans des échantillons d'environnement, il a été décidé de développer des outils d'identification rapide spécifiques à ces germes particuliers fréquents dans les conserves non stables à 55°C.

### Protocole

Dans un premier temps, l'espèce aérobie thermophile *G. stearothermophilus* et les espèces, non différenciables par le gène 16S, *M. thermoacetica/thermoautotrophica* (un des germes les plus thermorésistants rencontrés en agroalimentaire) ont été ciblées. Puis, dans un deuxième temps, les genres *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Caldanaerobium* et *Caldanaerobacter*, tous anaérobies thermophiles génétiquement proches, ont été ciblés avec un troisième jeu d'amorces. Pour *G. stearothermophilus*, c'est la région de l'ITS 16S-23S qui a été choisie alors que pour les genres anaérobies, c'est le 16S qui a été utilisé car suffisamment variable pour différencier les cibles du reste des microorganismes présents dans les conserves.

### Résultats

Après la définition des amorces spécifiques de chaque espèce et d'un programme d'amplification afin de pouvoir effectuer toutes les PCR au cours d'un même cycle, les protocoles définis ont été validés à l'aide de test de spécificité avec de nombreuses espèces voisines et des souches provenant aussi bien de collections internationales que de la souchothèque d'isolats industriels du CTCPA. La solution d'un cycle commun à tous les germes a été choisie car il n'a pas été possible de développer une PCR multiplex afin de limiter le nombre d'essais et d'obtenir en une seule fois l'identification du germe isolé du fait d'incompatibilités entre les amorces de *G. stearothermophilus* et de *Moorella*. La méthode a été nommée SporeTraQ™. Par la suite, le champ d'identification a été élargi avec *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *Clostridium thermopalmarium* et les différentes amorces ont été dessinées afin d'être compatibles avec le programme d'amplification originel.

### Valorisation

Aujourd'hui, cette amplification ciblée est utilisée couramment au laboratoire pour identifier ces espèces lorsqu'elles sont pressenties comme germe d'altération. Mais une autre utilisation est aussi possible, non plus lors d'identification *sensu stricto* mais en détection dès lors que le SporeTraQ™ est utilisé après un dénombrement de spores et que des colonies sont prélevées

pour mettre en évidence, ou non, la présence des germes ciblés. Dans ce cas, l'industriel n'a pas uniquement une simple réponse quantitative (nombre de spores), mais aussi une réponse qualitative (présence d'espèces) qui doit lui permettre de mieux apprécier sa contamination en spores bactériennes. En effet, lorsqu'il est caractérisé microbiologiquement une matière première, seul le dénombrement d'un type de flore est possible en routine. Lorsque la norme NF V 08-602 (Afnor 2011) est suivie, 4 types de flores sont dénombrées (flore aérobie ou anaérobie et flore mésophile ou thermophile), mais aucune occurrence sur les germes les plus thermorésistants n'est possible. Seule une détection par biologie moléculaire peut apporter cette information supplémentaire.

Cette mise au point d'une méthode originale a fait l'objet d'un article dans *Current Microbiology* en 2010.

## PCR Detection of Thermophilic Spore-Forming Bacteria Involved in Canned Food Spoilage

S. Prévost, S. André and F. Remize\*

Current Microbiology (2010), 61 (6) 525–533

CTCPA Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles, Site Agroparc, ZA de l'aéroport, BP 21 203, F-84 911 AVIGNON cedex 9, France.

Running title: Thermophilic bacteria detection in canned food

\* Corresponding author : Fabienne Remize, CTCPA Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles, Site Agroparc, ZA de l'aéroport, BP 21 203, F-84 911 AVIGNON cedex 9, France. Tel +33 490 84 17 09 ; Fax +33 490 84 17 26 ; email : fremize@ctcpa.org

### Abstract

Thermophilic bacteria that form highly heat-resistant spores constitute an important group of spoilage bacteria of low-acid canned food. A PCR assay was developed in order to rapidly trace these bacteria. Three PCR primer pairs were designed from rRNA gene sequences. These primers were evaluated for the specificity and the sensitivity of detection. Two primer pairs allowed detection at the species level of *Geobacillus stearothermophilus* and *Moorella thermoacetica/thermoautrophica*. The other pair allowed group-specific detection of anaerobic thermophilic bacteria of the genera *Thermoanaerobacterium*, *Thermoanaerobacter*, *Caldanaerobium* and *Caldanaerobacter*. After a single enrichment step, these PCR assays allowed the detection of 28 thermophiles from 34 cans of spoiled low-acid food. In addition 13 ingredients were screened for the presence of these bacteria.

This PCR assay serves as a detection method for strains able to spoil low-acid canned food treated at 55°C. It will lead to better reactivity in the canning industry. Raw materials and ingredients might be qualified not only for quantitative spore contamination, but also for qualitative contamination by highly heat-resistant spores.

**Key-words:** food spoilage, PCR, thermophilic bacteria, *Geobacillus*, *Moorella*, *Thermoanaerobacterium*

## Introduction

The thermal process applied during canning results in products which remain stable for long periods at ambient temperature. The minimum levels of heat treatment were determined on safety concerns to prevent the development of *Clostridium botulinum* [10]. However, this thermal treatment is not always sufficient to inactivate all spore-forming bacteria, especially those that are highly heat-resistant and non-pathogenic [13].

Spore-forming thermophilic bacteria are recognized as the main cause of spoilage of canned food [3, 8, 18]. The typical species of thermophilic bacteria found in canned products are *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* and *Moorella thermoacetica* for obligate anaerobes, plus *Geobacillus stearothermophilus* for facultative anaerobes [2, 5, 9]. *G. stearothermophilus* is the typical species responsible of “flat sour” spoilage, due to the production of acids but not gas from saccharides [7]. Thermophilic anaerobes usually produce abundant gas which results in swelling of cans. *M. thermoacetica* produces acetate as main fermentation product, and as such is termed acetogenic and used for biotechnological applications [7, 14]. These bacteria share the characteristic of being able to form highly heat-resistant spores [2, 4, 11]. The decimal reduction times is well established for *G. stearothermophilus* to a few min at 121°C [20, 26]. The spores of *M. thermoacetica* strains which survive autoclaving have decimal reduction times between 23 and 111 min at 121°C depending on sporulation conditions [4].

Thermal process setting requires taking into account spore heat resistance and population level, together with their ability to grow under ambient storage conditions [13, 17, 19].

Therefore, not only the number of heat-resistant spores but also the nature of bacteria is an important parameter regarding the potentially high heat resistance of endospores. In addition, identification of the bacteria which cause canned food spoilage can implement corrective and preventive action, as the thermal resistance of the spores and the conditions of growth and sporulation are known. These elements are then used in the processing lines, e.g. to control the thermal treatment applied, or to reduce the level of spore contamination at different steps of the process before heat treatment, through enhancement of hygiene procedures.

Nowadays, identification is performed by 16S rRNA gene sequencing, a method which requires multiple culture steps to achieve isolation and therefore is time-consuming and sometimes unsuccessful if the bacteria fail to grow. The improvement of industrial reactivity requires the design of molecular methods for fast detection of contaminants. In case of spoiled canned food, molecular tools need to detect thermophilic spore-forming bacteria. Specific



primers that amplify 16S rRNA gene and 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer (ITS) have been widely used as a target, and have given promising results [16, 21, 27]. In this study, three PCR primer pairs were developed from publicly available sequences to detect the most frequent spoilage thermophilic spore formers: *M. thermoacetica*, *G. stearothermophilus*, *Thermoanaerobacterium* spp. The specificity and the sensitivity of the primer sets were evaluated on DNA extracted from thermophilic bacteria obtained from collections and isolated from canned food samples. In addition, the potential of the PCR assay was assessed with non-stable canned food and ingredients.

## **Materials and methods**

### **Bacterial strains and culture conditions**

The strains used for specificity assays are shown in Tables 1 and 2. Types and reference strains were obtained from various culture collections and maintained in the laboratory. Other strains were collected and isolated from non-stable canned food and were identified by 16S rRNA gene sequencing.

Aerobic bacteria were grown in Brain-Heart Infusion (BHI) broth or in BCP glucose agar (dextrose tryptone agar) whereas anaerobic bacteria were grown in Rosenow Cysteine broth complemented with brain fragments and marble chips or in meat-liver glucose agar complemented with 2% yeast extract.

Thermophilic strains were incubated at 55°C. *Geobacillus* and *Thermoanaerobacterium* cultures were incubated for two days, while *Moorella* cultures were incubated for five days.

Other bacteria were incubated at 37°C for 48 hours.

### **PCR primers design**

Target sequences were selected from the National Centre for Biotechnology Information database. The sequences of the 16S rRNA gene and ITS 16S-23S regions were aligned in order to search for specific primer sites. A pair of oligonucleotides for each bacterial group was selected and synthesized by Eurogentec. The sequences and positions of oligonucleotides are presented in Table 3.

**Table 1** List of strains used for *G. stearothermophilus* detection specificity tests

species	bacterial strains	No of strains	source	PCR Gbs*
<i>G. stearothermophilus</i>	DSM 1550, 2804 001, 2804 017, 2804 019, 2804 030, 2804 033, 2804 037, 2804 038, 2804 039, 2804 052, 2804 053, 2804 054, 2804 055, 2804 056, 2804 057, 2804 116, 2804 129, 2804 144, 2804 145	19	DSMZ CTCPA	+
<i>Geobacillus kaustophilus</i>	DSM 7263	1	DSMZ	-
<i>Geobacillus subterraneus</i>	DSM 13 552	1	DSMZ	-
<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	DSM 730	1	DSMZ	-
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	DSM 465	1	DSMZ	-
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	DSM 2 542	1	DSMZ	-
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	DSM 5 366	1	DSMZ	-
<i>Geobacillus uzenensis</i>	DSM 13 551	1	DSMZ	-
<i>Geobacillus caldoxylosilyticus</i>	2801 003	1	CTCPA	-
<i>Geobacillus</i> sp	2810 004	1	CTCPA	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3101 006	1	CTCPA	-
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579	1	ATCC	-
<i>Bacillus circulans</i>	3104 002	1	CTCPA	-
<i>Bacillus coagulans</i>	3105 003, 3105 034	2	CTCPA	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	3107 028	1	CTCPA	-
<i>Bacillus smithii</i>	3108 002, 3108 004, 3108 017	3	CTCPA	-
<i>Bacillus subtilis</i>	3111 032, 3111 033, 3111 035, 3111 038	4	CTCPA	-
<i>Paenibacillus graminis</i>	2910 001	1	CTCPA	-
<i>Paenibacillus macerans</i>	2903 006, 2903 009, 2903 012, 2903 014	4	CTCPA	-
<i>Paenibacillus turicensis</i>	2907 001	1	CTCPA	-
<i>Lactobacillus sakei</i>	3009 005	1	CTCPA	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29 212	1	ATCC	-
<i>Escherichia coli</i>	DSM 30 083	1	DSMZ	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19 115	1	ATCC	-
<i>M. thermoacetica</i>	DSM 521	1	DSMZ	-
<i>M. thermoautotrophica</i>	DSM 1974	1	DSMZ	-
<i>M. thermoacetica /thermoautotrophica</i>	1901 056, 1901 057, 1901 058, 1901 059, 1901 060	5	CTCPA	-
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	2506 006, 3224 001	2	CTCPA	-
<i>Clostridium novyi</i>	3210 014, 3210 017, 3213 011	3	CTCPA	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	DSM 1734, 3213 018, 3213 020, 3222 004	4	DSMZ CTCPA	-
<i>Clostridium thermopalmarium / thermobutyricum</i>	3219 001, 3226 006	2	CTCPA	-

\* to detect *G. stearothermophilus*

**Table 2** List of strains used for *Moorella* and *Thermoanaerobacterium* detection specificity tests

species	bacterial strains	No of strains	source	PCR Moo*	PCR Thm**
<i>M. thermoacetica</i>	DSM 521	1	DSMZ	+	-
<i>M. thermoautotrophica</i>	DSM 1974	1	DSMZ	+	-
<i>M. thermoacetica / thermoautotrophica</i>	1901 043, 1901 056, 1901 057, 1901 058, 1901 059, 1902 051 1901 003, 1901 066,	6	CTCPA	+	-
<i>M. thermoacetica / thermoautotrophica</i>	1901 067, 1901 071, 1901 044	5	CTCPA	+	nd
<i>M. thermoacetica / thermoautotrophica</i>	1901 060, 1902 006	2	CTCPA	+	+
<i>Moorella glycerini</i>	DSM 11 254	1	DSMZ	-	nd
<i>Moorella mulderi</i>	DSM 14 980	1	DSMZ	-	nd
<i>Thermoanaerobacter mathranii / thermocopriae</i>	2105 001, 3220 003, 2503 001	3	CTCPA	-	+
<i>Thermoanaerobacterium aciditolerans / aotearoense</i>	2502 001, 2503 020, 2503 018, 2503 008, 2501 001	5	CTCPA	-	+
<i>T. aciditolerans</i>	DSM 16 487	1	DSMZ	+	+
<i>T. aciditolerans / aotearoense</i>	2503 014, 2503 019	2	CTCPA	+	+
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	2505 001, 2506 007, 2503 012	3	CTCPA	-	+
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	2503 009	1	CTCPA	-	+
<i>Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum</i>	DSM 571	1	DSMZ	-	+
<i>T. thermosaccharolyticum</i>	2506 006, 3224 001, 2503 010	3	CTCPA	-	+
<i>T. thermosaccharolyticum</i>	2503 006, 2503 015, 2506 011	3	CTCPA	+	+
<i>Thermoanaerobacterium zaeae</i>	2507 001	1	CTCPA	-	+
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	2506 012	1	CTCPA	-	-
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	DSM 7060	1	DSMZ	-	-
<i>Caldanaerobium fijensis</i>	2503 013	1	CTCPA	-	+
<i>Clostridium bifermentans</i>	DSM 630	1	DSMZ	-	-
<i>Clostridium cochlearium</i>	3206 002	1	CTCPA	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	3210 014, 3210 017, 3210 011	3	CTCPA	-	-
<i>Clostridium sporogenes</i>	3213 018, 3213 020, 3222 004, DSM 1734	4	DSMZ	-	-
<i>Clostridium thermobutyricum / thermopalmarium</i>	3219 001, 3226 006	2	CTCPA	-	-
<i>Clostridium thermobutyricum / thermopalmarium</i>	3226 004, 3226 005	2	CTCPA	nd	-
<i>Clostridium thermopalmarium</i>	DSM 2544	1	DSMZ	nd	-
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	3110 006	1	CTCPA	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	3105 034	1	CTCPA	-	-
<i>Bacillus coagulans</i>	3105 003	1	CTCPA	-	nd
<i>Bacillus coagulans</i>	DSM1	1	DSMZ	nd	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	3107 028	1	CTCPA	-	-
<i>Bacillus licheniformis</i>	3107 001, 3107 014	2	CTCPA	-	nd
<i>Bacillus smithii</i>	3108 017	1	CTCPA	-	-

<i>Bacillus subtilis</i>	3111 032, 3111 033, 3111 038	3	CTCPA	-	-
<i>G. stearothermophilus</i>	2804 144, 2804 145	2	CTCPA	-	-
<i>Paenibacillus macerans</i>	2903 006, 2903 014	2	CTCPA	-	-
<i>Lactobacillus sakei</i>	3009 005	1	CTCPA	-	-

\* to detect *M. thermoacetica* ; \*\* to detect the *Thermoanaerobacterium* group; nd: not determined

**Table 3** Primers used in this study

Reaction	region	name	sequence
PCR <i>Moorella</i> F	rRNA 16S	FD1	AGAGTTTGATCHTGGCTCAG
PCR <i>Moorella</i> R	rRNA 16S	R3	AAAGGCTATTCGCCTTTAAGAC
PCR <i>Thm</i> F	rRNA 16S	772F2	TGGCGAAAGCGGCTCTCTGG
PCR <i>Thm</i> R	rRNA 16S	1239R	CCCCACCTTCCTCCGTG
PCR <i>Geobacillus</i> F	rRNA ITS 16S-23S	Fits2	GGGGAAGCGCCGCGTTCGG
PCR <i>Geobacillus</i> R	rRNA ITS 16S-23S	Rits2	GTGCAAGCACCTTGCAGGCGAAGA
universal PCR F	rRNA 16S	FD1	AGAGTTTGATCHTGGCTCAG
universal PCR R	rRNA 16S	RD1	GGMTACCTTGTTACGAYTTC
sequencing R	rRNA 16S	S6-16S	GTATTACCGCGGCTGCTG

#### DNA preparation and PCR optimization

DNA was prepared from picked colonies or from 1 mL liquid culture with the InstaGene™ (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) matrix following manufacturer's instructions.

All amplification steps were performed in 25 µL tubes with an Applied Biosystem GeneAmp PCR system 9700. The reactions were performed with 5 µL of DNA matrix, 0.2 mM dNTPs, 1x Taq reaction buffer, 2 units of Taq polymerase AmpliTaq (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France), 0.3 µM of each primer and 1.5 to 3 mM MgCl<sub>2</sub>. The PCR was cycled once at 94°C for 5 min, 40 repetitions at 94°C for 1 min, 65°C as indicated for 1 min, 72°C for 1 min, and once at 72°C for 10 min. On completion of cycling, amplicons were directly analysed by electrophoresis in TAE 1% agarose gel.

The specificity was optimized by adjusting annealing temperature and magnesium chloride concentration.

16S rRNA gene amplification was performed with primers FD1 and RD1 [29]. Sequencing was carried out by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

### Sensitivity assays

The sensitivity was determined for each of the three PCR primer pairs with DNA from different strains. The level and purity of the purified DNA were evaluated by measuring OD 260 and 280 nm and confirmed by amplification with universal primers. The level of DNA was adjusted to 1 µg for 5 µl and serially diluted in triplicate in ultrapure water. Each DNA extract corresponding to one dilution level was tested for PCR amplification in duplicate, so that at least six PCR tests were obtained for each concentration. The lowest amount of DNA with a positive amplification in most tests was chosen as the sensitivity limit.

### Examination of canned food

Non-stable canned products were detected after an incubation of seven days at 55°C according to NF V08-408 [1]. Samples of 25 or 50g of non-stable products were diluted 2-fold in peptone water and homogenized with a stomacher for 1 min. The stomacher bag filtrate was used to inoculate broth which was then incubated at 55°C for 2 to 5 days. Identification was performed from positive culture broth tubes, preferentially anaerobic tubes if available. It was further confirmed by 16S rRNA gene sequencing of DNA extracted from isolated colonies obtained from the same broth tube by plating onto the adequate medium.

### Examination of ingredients

Samples of 25g of ingredients were diluted 10-fold in peptone water and homogenized with a stomacher for 1 min. The obtained stomacher bag filtrate was treated for 10 min at 100°C to eliminate vegetative cells and then used for serial dilutions in peptone salt broth. For CFU determination, the dilutions were poured into two media. BCP glucose agar was used to determine aerobic thermophilic counts and was incubated for 2 days at 55°C. Meat-liver glucose agar was used to determine anaerobic thermophilic counts and was incubated for 5 days at 55°C. For PCR assay, up to 10 colonies if available were randomly picked prior to DNA isolation.

## Results

### PCR specificity for *G. stearothermophilus*

A PCR assay was developed from available sequence data to detect the aerobic thermophile *G. stearothermophilus*. A specific primer pair was designed in the rRNA internal transcribed sequence (ITS) 16S-23S (Table 3). The assay optimisation resulted in the choice of an annealing temperature of 65°C with 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>.

The specific amplification of a 302 bp fragment was obtained for 19 *G. stearothermophilus* isolates while no amplicon was obtained from nine strains belonging to other *Geobacillus* species (Table 1). Forty-one other non-*Geobacillus* strains were not detected by the assay. Among them, the most closely related species were the thermophilic species *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus smithii* belonging to Bacillaceae family.

### PCR specificity for the detection of *M. thermoacetica* /*thermoautotrophica* and *Thermoanaerobacterium* group

The PCR assay developed to detect *M. thermoacetica* /*thermoautotrophica* detection triggered the 16S rRNA gene region (Table 3). From a genetic point of view, *M. thermoacetica* and *M. thermoautotrophica* present differences in 16S rRNA gene sequences of less than 1% [5]. The forward primer FD1 was described by Weisburg et al. (1991) for use as a universal 16S rRNA coding region amplification primer. A reverse primer R3 was designed by sequence alignments. The use of these primers allowed the amplification of a single 488 bp fragment at an annealing temperature of 65°C with 3 mM MgCl<sub>2</sub>.

PCR specificity was assayed against 15 *M. thermoacetica* /*thermoautotrophica* isolates, one *Moorella glycerini* and one *Moorella mulderi* (Table 2). All *M. thermoacetica* /*thermoautotrophica* strains were detected, while other species of the same genus were not. Fifty-one other isolates were used for exclusivity assays. Among them, anaerobic thermophilic bacteria accounted for 33 of the isolates. Unexpectedly, three *Thermoanaerobacterium aciditolerans/aotearoense* and three *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* strains generated positive signals. Sequencing of the 16S rRNA coding region of these strains did not show higher similarity with the R3 primer than did DNA from other *Thermoanaerobacterium* strains like DSM 7060, which did not generate positive signals with the *M. thermoacetica* /*thermoautotrophica* detection assay.

Primers were designed in the 16S rRNA gene region by alignment from all *Thermoanaerobacterium* sequences available (Table 3). A maximal score was obtained for DNA regions from the following genera: *Thermoanaerobacter*, *Thermoanaerobacterium*, *Caldanaerobium* and *Caldanaerobacter*. These primers were also checked against other spore-forming bacteria sequences. PCR optimization was performed with cycle conditions identical to the PCR runs for *M. thermoacetica* /*thermoautotrophica* and *G. stearothermophilus*. It showed that 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> was optimal regarding specificity. Twenty-two isolates of the industrial and collection strains of *Thermoanaerobacterium* spp, three isolates of *Thermoanaerobacter thermocopriae/mathranii* and one isolate of *Caldanaerobium fijensis* were assayed. Two of them, DSM 7060 and 2506 012 were not detected by this assay (Table 2), but were amplified by universal PCR. Sequence analysis from the former did not reveal any mismatch. Ten isolates of the closely related species *M. thermoacetica* were tested and two of these led to positive detection. As expected, the 29 isolates from other species, including anaerobic thermophiles such as *Clostridium novyi* and *Clostridium thermopalmarium*, did not lead to positive detection.

The PCR test to detect *M. thermoacetica* /*thermoautotrophica* isolates was able to detect the species. The other PCR assay detected *Thermoanaerobacterium* and its closest relatives, and was named the *Thermoanaerobacterium* group detection assay. For two *M. thermoacetica* /*thermoautotrophica* and six *Thermoanaerobacterium* sp strains a positive signal was obtained with the two PCR assays that trigger anaerobic bacteria rRNA gene. In these cases, complementary experiments such as sequencing of 16S rRNA coding region are necessary to confirm the identification.

#### Sensitivity of PCR detection

Sensitivity assays were performed with the three PCR assays herein described as well as with the universal PCR assay (Figure 1). The most sensitive PCR was the one aiming to detect *G. stearothermophilus*. The sensitivity level of this assay was evaluated at 0,5 pg. The least sensitive assay was that for *M. thermoacetica* detection, with a level of 500 pg. The detection limit for the *Thermoanaerobacterium* group PCR assay was estimated at 50 pg. It was identical to the latter for universal PCR assay.



Detection of thermophilic bacteria in non stable canned products

**Table 4** Detection of thermophilic bacteria from 55°C non-stable canned food

Sample	Product	PCR positive detection and/or rRNA gene sequencing identification*
CT196	Canned fish-based course	<i>G. stearothermophilus</i> *
CT197	Canned meat	<i>G. stearothermophilus</i> *
CT198	Canned fish-based course	<i>G. stearothermophilus</i> *
CT199	Meat dumpling	<i>G. stearothermophilus</i> *
CT248	Canned meat	<i>G. stearothermophilus</i> *
CT260	Sweet corn	<i>G. stearothermophilus</i>
CT263	Sweet corn	<i>G. stearothermophilus</i>
D8137	Fish dumpling	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> *
D8161	Pre-cooked meal with meat	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> *
D8162	Cooked vegetables	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> *
CT090	Pre-cooked meal with meat	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> *
CT027	Pre-cooked meal with chicken	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i>
CT071	Green peas and carrots	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> *
CT073	Green peas	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> *
CT089	Green peas	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i>
CT141	Mixed vegetables	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> *
CT201	Peas	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> *
CT217	Peas	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i>
CT256	Peas	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i>
CT274	Pre-cooked meal with meat	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i>
CT195	Pre-cooked meal with meat	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i> *
CT086	Peas	<i>Thermoanaerobacterium</i> group*
CT109	Peas	<i>Thermoanaerobacterium</i> group*
CT124	Peas	<i>Thermoanaerobacterium</i> group
CT125	Pre-cooked meal with meat	<i>Thermoanaerobacterium</i> group*
CT149	French beans	<i>Thermoanaerobacterium</i> group*
CT070	Peas	<i>Thermoanaerobacterium</i> group*
CT072	Paté	<i>Thermoanaerobacterium</i> group*
CT135	Soup	<i>Bacillus licheniformis</i> *
CT087	Paté	<i>Bacillus licheniformis</i> *
CT213	Paté	<i>Bacillus smithii</i> *
CT228	Pre-cooked meal with meat	<i>Clostridium novyi</i> *
CT169	Paté	<i>Clostridium thermopalmarium</i> *
CT017	Pre-cooked meal with fish	<i>Paenibacillus graminis</i> *

\* corresponds to strains which were isolated and further identified by 16S rRNA gene sequencing.



In order to test whether the PCR assays were appropriate for the investigation of non-stable canned food, we tested 34 products which had failed the stability test performed at 55°C (Table 4). After a single enrichment step and quick DNA extraction, the samples were tested with the three PCR assays.

*G. stearothermophilus* was detected in seven non-stable samples. Fourteen samples tested positive for *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* and 7 were positive for *Thermoanaerobacterium* group bacteria. Seven samples generated negative PCR tests even though the cultures were visually positive. These samples were used to isolate and identify bacteria by 16S rRNA gene sequencing. Identification showed the presence of two strains of *Bacillus licheniformis*, one *Bacillus smithii*, one *Clostridium novyi*, one *Clostridium thermopalmarium* and one *Paenibacillus graminis*.

#### Detection of thermophilic bacteria in ingredients

**Table 5** Spore enumeration and PCR assays of ingredients and raw materials

Product	Thermophilic anaerobic spores counts (cfu/g)	Thermophilic aerobic spores counts (cfu/g)	PCR positive detection
Cocoa and dry milk	1700	220	<i>G. stearothermophilus</i>
Milk powder	20	<10	<i>G. stearothermophilus</i>
Milk powder	1200	400	<i>G. stearothermophilus</i>
Spices	100	nd	<i>G. stearothermophilus</i>
Cocoa and dry milk	1800	220	<i>G. stearothermophilus</i>
Milk powder	1000	50	<i>G. stearothermophilus</i>
Pre-cooked meal with meat	<10	40	<i>G. stearothermophilus</i>
Milk powder	1000	50	<i>G. stearothermophilus</i> and <i>Thermoanaerobacterium</i> group
Milk powder	nd	400	none
Dry garlic	nd	1000	none
Spices	nd	40	none
Pre-cooked meal with meat	<10	320	none

Ingredients may be the entrance point for highly heat-resistant bacteria in food [19]. In particular, milk powders, which are produced by a heating process, are known to present thermophilic bacteria spore contamination occasionally [6, 22]. Thermophilic bacteria spores were counted in 13 ingredients such as spices, milk powder and aromas. DNA was extracted

from randomly picked colonies and used in PCR assays. *G. stearothermophilus* or *Thermoanaerobacterium* group bacteria were detected by the assay in several samples (Table 5). No correlation was observed between colony counts and positive PCR tests. This was expected because heat-resistant spores present a remarkable diversity in milk powders and spices [19, 22].

## Discussion

*M. thermoacetica*, *G. stearothermophilus* and *Thermoanaerobacterium* spp are among the most frequent contaminants causing low acid canned food spoilage [2, 5, 9]. These thermophilic bacilli are of hygienic concern to the manufacturers and processors of low acid canned food, and the ability to monitor these contaminants before or after thermal processing would have economic benefits. Remarkably, the first reports on the presence of thermophilic bacteria causing flat souring or swelling of canned food date from a about 80 years [28], but rapid microbiology tools were rarely reported in spite of their recognized value [9, 15]. This study describes the development of a PCR assay to detect thermophilic bacteria forming highly heat-resistant spores that may pass through retort process of low acid canned food.

An extensive specificity study is reported with both collection strains and strains collected from industrial environments. The possibility that strains from the same taxonomical group but isolated from different sources result in a negative result with a detection PCR is well documented for *Bacillus sporothermodurans* [12, 27]. A high specificity level was established for our PCR assay designed at the species level for *G. stearothermophilus*. A species-specificity level was obtained for the *M. thermoacetica* /*thermoautotrophica* detection assay, whereas the PCR assay for the *Thermoanaerobacterium* group detected all tested *Thermoanaerobacterium* species, but also the closest relatives belonging to *Thermoanaerobacter* and *Caldanaerobium* genera. These two PCR assays which trigger thermophilic obligate anaerobes presented some overlaps regarding the detected isolates.

All three PCR assays were able to detect low levels of DNA. However, high sensitivity is not an absolute requirement since these assays were developed with an enrichment step from canned food or from colonies picked from ingredients.

This assay showed its relevance for the identification of bacteria responsible for low-acid canned spoilage at 55°C. It allowed the cause to be detected rapidly and without isolation of bacteria in more than 80% of examined cases.

In addition, this assay was useful for ingredient qualification. Indeed, thermophilic spore counts, without species consideration, are an important issue for risk assessment [23-25]. It takes into account the large diversity of spore formers in food environment. But also the detection of highly heat-resistant species is important. Adjustment of food retort settings takes into account historic data collection about spore contamination levels of ingredients and raw materials. To optimize sterilization processes, the heat resistance of contaminating spores must be considered. The tools developed here enable ingredients to be qualified. Similarly, PCR methods were developed for *B. sporothermodurans* and were further used to explore possible contamination routes [27].

### **Acknowledgements**

This work received financial support from FranceAgriMer and French canners.

### **References**

1. Anonymous (1997) Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés - Méthode de routine, in Microbiologie des aliments, AFNOR (Association Française de Normalisation): Paris.
2. Ashton D (1981) Thermophilic microorganisms involved in food spoilage: thermophilic anaerobes not producing hydrogen sulfide. J Food Protect. 44(2): 146-148.
3. Ashton D and Bernard D (1992) Thermophilic anaerobic sporeformers, in Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd Edition, Vanderzantz C. and Splittstoesser D.F., Editors. American Public Health Association: Washington, D.C. pp. 309-316.
4. Byrer DE, Rainey FA, and Wiegel J (2000) Novel strains of *Moorella thermoacetica* form unusually heat-resistant spores. Arch Microbiol. 174(5): 334-9.
5. Carlier JP and Bedora-Faure M (2006) Phenotypic and genotypic characterization of some *Moorella* sp. strains isolated from canned foods. Syst Appl Microbiol. 29(7): 581-8.
6. Cooper RM and Mc Killip JL (2006) Enterotoxigenic *Bacillus* spp. DNA fingerprint revealed in naturally contaminated nonfat dry milk powder using rep-PCR. J Basic Microbiol. 46(5): 358-64.

7. De Vos P, Garrity GM, Jones D, et al., eds. (2009) Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 3: The Firmicutes (2nd Ed.) Springer, pp 1450.
8. Denny CB and Corlett DAJ (1992) Canned foods - Tests for cause of spoilage, in Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd Edition, Vanderzantz C. and Splittstoesser D.F., Editors. American Public Health Association: Washington, D.C. pp. 1051-1092.
9. Dotzauer C, Ehrmann M, and Vogel R (2002) Occurrence and detection of *Thermoanaerobacterium* and *Thermoanaerobacter* in canned food. Food Technol. Biotechnol. 40(1): 21-26.
10. Esty JR and Meyer KF (1922) The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. XI. J Infect Dis. 31: 650-663.
11. Feeherry FE, Munsey DT, and Rowley DB (1987) Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. Appl Environ Microbiol. 53(2): 365-70.
12. Herman LM, Vaerewijck MJ, Moermans RJ, et al. (1997) Identification and detection of *Bacillus sporothermodurans* spores in 1, 10, and 100 milliliters of raw milk by PCR. Appl Environ Microbiol. 63(8): 3139-43.
13. Hornstra LM, Ter Beek A, Smelt JP, et al. (2009) On the origin of heterogeneity in (preservation) resistance of *Bacillus* spores: input for a 'systems' analysis approach of bacterial spore outgrowth. Int J Food Microbiol. 134(1-2): 9-15.
14. Karnholz A, Kusel K, Gossner A, et al. (2002) Tolerance and metabolic response of acetogenic bacteria toward oxygen. Appl Environ Microbiol. 68(2): 1005-9.
15. Kotzekidou P (1996) A microtitre tray procedure for a simplified identification of *Bacillus* spp. in spoiled canned foods. Food Microbiol. 13: 35-40.
16. Liu D (2008) Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. Int J Food Microbiol. 122(3): 229-242.
17. Mafart P (2000) Taking injuries of surviving bacteria into account for optimising heat treatments. Int J Food Microbiol. 55: 175-179.
18. Olson KE and Sorrells KM (1992) Thermophilic flat sour sporeformers, in Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd Edition, Vanderzantz C. and Splittstoesser D.F., Editors. American Public Health Association: Washington, D.C. pp. 299-308.

19. Oomes SJ, van Zuijlen AC, Hehenkamp JO, et al. (2007) The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *Int J Food Microbiol.* 120(1-2): 85-94.
20. Penna TC, Machoshvili IA, Taqueda ME, et al. (2000) The effect of media composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*. *PDA J Pharm Sci Technol.* 54(5): 398-412.
21. Robert H, Gabriel V, and Fontagne-Faucher C (2009) Biodiversity of lactic acid bacteria in French wheat sourdough as determined by molecular characterization using species-specific PCR. *Int J Food Microbiol.* 135(1): 53-59.
22. Ruckert A, Ronimus RS, and Morgan HW (2004) A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *Int J Food Microbiol.* 96(3): 263-72.
23. Rueckert A, Ronimus RS, and Morgan HW (2005) Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. *J Microbiol Methods.* 60(2): 155-67.
24. Rueckert A, Ronimus RS, and Morgan HW (2005) Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. *J Appl Microbiol.* 99(5): 1246-55.
25. Rueckert A, Ronimus RS, and Morgan HW (2006) Development of a real-time PCR assay targeting the sporulation gene, *spo0A*, for the enumeration of thermophilic bacilli in milk powder. *Food Microbiol.* 23(3): 220-30.
26. Sasaki K, Shintani H, Itoh J, et al. (2000) Effect of calcium in assay medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. *Appl Environ Microbiol.* 66(12): 5509-13.
27. Scheldeman P, Herman L, Goris J, et al. (2002) Polymerase chain reaction identification of *Bacillus sporothermodurans* from dairy sources. *J Appl Microbiol.* 92(5): 983-991.
28. Shaw M (1928) Thermophilic bacteria in canned foods. *J Infect Dis.* 43(5): 461-474.
29. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173(2): 697-703.

## 5 - RESULTATS-DISCUSSIONS

---

## 5.1. Caractérisation de la flore d'altération des conserves en France

Le procédé de l'appertisation permettant d'obtenir des produits stables à température ambiante utilise le principe d'un traitement thermique détruisant toutes formes végétatives microbiennes présentes dans une matrice alimentaire placée dans un emballage étanche. Ce traitement thermique a pour but d'éliminer les flores pathogènes ayant un impact sanitaire ainsi que la flore d'altération conduisant à des pertes financières pour les industriels. Mais dans certains cas, des germes, sous la forme de spores, survivent au traitement et ont la capacité à se développer dans la conserve. Et lorsque la croissance d'un germe est détectée, il est alors important de l'identifier afin de pouvoir prendre des mesures correctives appropriées vis à vis de l'espèce identifiée.

### 5.1.1. Description de la flore responsable de non stabilité de conserves à 55°C (article 2)

#### Contexte

Au début des années 2000, lorsque les industriels de la conserve ont souhaité améliorer la qualité hygiénique de leurs lignes de production vis-à-vis des germes sporulants, il a été nécessaire de commencer par identifier la flore d'altération afin de connaître les germes responsables de ce défaut. Les non stabilités rencontrées dans les stocks ou lors d'incubations mésophiles étant rares ou facilement explicables (défaut d'étanchéité des emballages, traitement thermique non maîtrisé ou non approprié), la non stabilité à 55°C a été plus spécifiquement étudiée.

#### Protocole

Face à des cas de produits appertisés altérés, dit non stables, qui subsistaient malgré la mise en place de démarches visant à maîtriser le risque microbiologique tel que l'HACCP (Hazard Analysis and Critical Point Determination), le CTCPA, à la demande des industriels, a initié en 2001 une étude systématique des cas d'altération dont l'objectif était d'améliorer la connaissance sur l'origine de ces défauts. Pour cela, la première étape a été de collecter un maximum d'échantillons non conformes afin d'obtenir une banque de données commune à tous les industriels. De plus, cette mutualisation des résultats a permis d'identifier et de différencier les problématiques communes à la profession des incidents individuels. En parallèle à l'enregistrement des données d'altération des produits (modifications physico-chimiques du produit), les germes responsables étaient identifiés. Ces germes responsables

d'altération à 55°C étant peu étudiés par la communauté scientifique, une étude pour caractériser leur résistance thermique à l'aide d'une méthodologie commune a été menée. Le nombre annuel d'identifications effectuées (50 à 80) sur plusieurs années successives a permis la détermination des occurrences de toutes les espèces identifiées. Ces occurrences sont d'autant plus robustes que la pluri annualité a permis de gommer les artéfacts de représentativité des échantillons envoyés volontairement par les industriels. De plus, l'apparition de nouvelles espèces a pu être suivie. L'analyse des échantillons non stables à 55°C effectuée au départ simplement pour valider la stabilité de conserves dans des conditions dites de transport à l'export, a été synthétisée dans ce bilan effectué après 10 ans de travail pour leur intérêt comme indicateur d'hygiène.

### Résultats

Les résultats obtenus sur 455 cas expertisés peuvent se résumer en 2 grands axes. Premièrement, seulement deux espèces sont responsables de plus de 66% des cas non stables à 55°C : *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* et *G. stearothermophilus* et ce quel que soit le type de recettes (légumes, plats cuisinés avec ou sans viande et/ou produits de la mer). De même, selon les produits, des spécificités ont pu être observées comme *C. thermopalmarium* / *thermobutyricum* qui a été identifié uniquement dans du foie gras ou *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* responsable de 66% des cas non stables de petits pois. A contrario, *G. stearothermophilus* est ubiquitaire et cela confirme son choix comme germe généralement utilisé dans le domaine de la conserve pour la validation des barèmes de stérilisation. Dans un deuxième temps, la majorité des souches ayant été conservée, il a été facile d'utiliser ces isolats sauvages dans le cadre de challenge-tests ou pour développer et valider des outils de biologie moléculaire. Par exemple, le choix des germes pour le développement de la méthode SporeTraQ™, tout comme celui d'acquérir des données de résistance thermique intra et interspécifique, a été effectué à l'aide des occurrences observées suivant un ordre décroissant. A ce niveau, la relation « plus un germe possède un optimum de croissance à une température élevée, plus sa résistance thermique est élevée » a été confirmée. Et il a été observé que les germes méso-thermophiles possèdent une variabilité de résistance thermique plus élevée par rapport aux germes strictement mésophiles ou thermophiles peu variables. Ces données ont permis d'améliorer les réponses ou les actions à apporter sur ligne industrielle suite à la détection de non stabilités.



## Valorisation

Aujourd'hui, et après de nombreuses discussions et débats, les industriels français ont admis l'intérêt de la stabilité à 55°C qui a longtemps été considérée comme un frein à la vente car utilisé en routine en France quel que soit le contexte. Dans les autres pays, ce test n'est demandé que dans le cas d'export des produits dans des zones chaudes. Son grand avantage, par rapport au test à 37°C, qui permet de mettre en évidence un risque sanitaire pour le consommateur, est qu'il ne conduit pas à un retrait-destruction du lot. Sous certaines réserves, un lot non stable à 55°C peut donc être commercialisé. Cependant, le suivi de l'évolution du taux de non stabilité d'une recette au cours du temps permet, lorsque une dérive est observée, de réagir sur la ligne sans impacter les ventes. Et par ricochet, toutes actions visant à améliorer l'hygiène microbiologique d'un outil de production vis-à-vis de germes thermophiles conduit *de facto* à améliorer la maîtrise des germes mésophiles potentiellement pathogènes et donc au final la maîtrise de la qualité sanitaire du produit.

Nous présentons ici les résultats de cette étude publiée dans International Journal of Food Microbiology en 2013.

## Thermophilic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned food and their heat resistance. Results of a French ten-year survey

S. André\*<sup>1</sup>, F. Zuber<sup>1</sup>, F. Remize<sup>1,2</sup>

International Journal of Food Microbiology (2013), 165 134–143

<sup>1</sup> CTCPA Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles, Site Agroparc, ZA de l'Aéroport, BP 21 203, F-84 911 AVIGNON cedex 9, France.

<sup>2</sup> Present address: Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Sciences des Aliments, ESIROI Agroalimentaire, Université de la Réunion, Parc Technologique Universitaire, 2 rue Joseph Wetzell, F-97490 Sainte-Clotilde, France

\* Corresponding author: Stéphane ANDRÉ, CTCPA Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles, Site Agroparc, ZA de l'aéroport, BP 21 203, F-84 911 AVIGNON cedex 9, France. Tel +33 490 84 17 09; Fax +33 490 84 17 26; email: sandre@ctcpa.org

### Abstract

Thermal processing of Low Acid Canned Foods (LACF), which are safe and shelf-stable at ambient temperature for several years, results in heat inactivation of all vegetative microorganisms and the partial or total inactivation of spores. Good Manufacturing Hygienic Practices include stability tests for managing the pathogen risk related to surviving mesophilic bacterial spores. LACF are also often submitted to additional incubation conditions, typically 55°C for 7 days, to monitor spoilage by thermophiles. In this study we identified the bacterial species responsible for non-stability after prolonged at 55°C incubation of LACF from 455 samples collected from 122 French canneries over 10 years.

Bacteria were identified by microsequencing or a recent developed tool for group-specific PCR detection (SporeTraQ™). A single species was identified for 93% of examined samples. Three genera were responsible for more than 80% of all non-stability cases: mostly *Moorella* (36%) and *Geobacillus* (35%), and less frequently *Thermoanaerobacterium* (10%). The other most frequent bacterial genus identified were *Bacillus*, *Thermoanaerobacter*, *Caldanaerobius*, *Anoxybacillus*, *Paenibacillus* and *Clostridium*.

Species frequency was dependent on food category, i.e. vegetables, ready-made meals containing meat, seafood or other recipes, products containing fatty duck, and related to the intensity of the thermal treatment applied in these food categories. The spore heat resistance parameters (D or  $\delta$  and z values) from 36 strains isolated in this study were determined. Taken together, our results single out the species most suitable for use as indicators for thermal process settings. This extensively-documented survey of the species that cause non-stability at 55°C in LACF will help canneries to improve the management of microbial contamination.

**Key words:** Low-Acid Canned Food, Thermophilic, Spores, Stability, Heat Resistance, Spoilage

**Abbreviations:** *A.*: *Anoxybacillus*, *B.*: *Bacillus*, *Cr.*: *Caldanaerobacter*, *Ca.*: *Caldanaerobius*, *C.*: *Clostridium*, *Ge.*: *Gelria*, *G.*: *Geobacillus*, *M.*: *Moorella*, *P.*: *Paenibacillus*, *Th.*: *Thermoactinomyces*, *Tr.*: *Thermoanaerobacter*, *Tm.*: *Thermoanaerobacterium*

## Introduction

Low Acid Canned Foods (LACF according to Codex Alimentarius, 1979) are thermally processed to ensure “commercial sterility” of the food product at ambient temperature for long-term storage. The biological stabilization process requires sufficient heat treatment, at temperatures above 100°C at every point of the container. This process results in the total inactivation of all vegetative bacteria and partial or total inactivation of spores. The pathogen risk related to surviving of mesophilic bacterial spores is managed according to Good Manufacturing Hygienic Practice guidelines (Codex Alimentarius, 1979, CTCPA, 2012a; CTCPA, 2012b). In addition, stability tests involving food container incubation are widely used to detect the possible development of surviving spores. The Codex Alimentarius recommends that food containers should be incubated for 10 or 14 days at 37°C (Codex Alimentarius, 1979). Under French standards NF V08-401 (Afnor, 1997a) and NF V08-408 (Afnor, 1997b), samples are incubated at 37°C for 7 days or 32°C for 21 days. It has been shown that these conditions allow surviving mesophilic spores to germinate and grow in the canned food. Spoilage resulting from microbial growth is then detected by gas production (container swelling), abnormal odours / colours or pH variation, and possibly microscopy examination. If samples test positive, the canned food batch is destroyed to prevent food

safety issues. Industrial canning industry processes are consequently designed to reach sterilization values ( $F_0$ , min) that ensure “commercial sterility” and therefore microbiological food safety.

The simulation of excessive temperature conditions during storage (transport and retail, especially in relation to exports to the countries with high ambient temperatures) uses other incubation conditions to test canned food stability, typically 55°C for different durations according countries guidelines. Although thermophilic spore-forming bacteria are not described as pathogenic, their presence may impair the commercial viability of products stored at high ambient temperatures. In addition, LACF non-stability detected after prolonged 55°C incubation reflects insufficient control of hygiene during the end-to-end food processing chain, mainly due to: i) insufficient heat treatment and/or ii) the presence of highly heat-resistant spores on processing lines and raw materials, even at low concentrations.

Therefore, global hygiene management on industrial-line processes essentially relies on surveys of the thermophilic spores that contaminate food before the can sterilization step. Consequently the canning industry needs better knowledge of thermophilic spore-forming bacteria and their origin on processing lines in order to ensure better process control of hygiene conditions.

Only a handful of now outdated studies have addressed the identification and occurrence of spore-forming bacteria responsible for canned food spoilage (Richardson, 1972; Pflug et al., 1981; Matsuda et al., 1985b), and most of these studies remained limited to a single product category (Vicini, 1986) or a single group of microorganisms (Matsuda et al., 1985a; Dotzauer et al., 2002). Taxonomy has since evolved to integrate new species definitions, and strain isolation and identification techniques have made great strides forward. The aims of this study were: i) to identify the bacterial species responsible for spoilage in 55°C-incubated LACF and ii) to bring insight on the possible causes of canned food non-stability and the species present in spoiled products. The species detected were characterized to help develop better monitoring protocols and detect emerging and/or poorly described species. Spoiled canned food samples were collected in France over a ten-year period.

## **Material and methods**

### **1.1. Sampling**

From 2001 to 2010, French canners sent samples of spoiled LACF detected after incubation tests performed at 55°C to the CTCPA (French Technical Center for the Preservation of Agricultural Products) for laboratory analysis in order to isolate and identify the microorganisms present in the cans.

Samples were grouped into three recipe categories: vegetables (21 different recipes); ready-made meals containing essentially meat (15 different recipes), seafood (6 different recipes) or other courses (7 different recipes); products containing fatty duck (two different recipes). The heat treatments used for the canned food were grouped into three categories: low-heat treatments levels with a  $F_0$  of less than 5 min ; moderate-heat treatments levels with  $F_0$  values between 5 and 20 min ; and high-heat treatments levels with a  $F_0$  of over 20 min.

Samples were detected spoiled after incubation at 55°C for 7 days as proposed by French standard NF V08-408 (Afnor, 1997b). According to this standard, non-stability is primarily detected by a change in packaging aspect. After aseptically opening the container, the odor and appearance of the food product were recorded and pH was determined to detect variation between 55°C-incubated samples and room temperature-incubated controls. Microscopy analysis was performed if required.

### **1.2. Culture of bacteria**

AFNOR-CNERNA guidelines were used to revivify viable bacteria from spoiled products (Bouvier et al., 1982) by homogenizing 10 g samples with an 90 ml of peptone water (AES Chemunex, Ivry-sur-Seine, France) in a stomacher for 1 min. Around 10 mL of the stomacher bag filtrate were collected into a glass tube and treated at 10 min at 100°C in a water bath was applied to select heat-resistant spores by killing all vegetatives cells and favoring spore germination. Both non-heated and heated 1 mL-homogenized-and-filtered samples were used to inoculate broths described in Bouvier et al. (1982). Incubation lasted 7 days at 37°C or 55°C and aerobically or anaerobically by the use of a paraffin stopper.

For isolation, bacterial cultures were plated on dextrose tryptone agar or meat-liver glucose agar (Biokar, Beauvais, France) and incubated at the same temperature and atmosphere as the earlier liquid culture. The same culture conditions were used for enumeration using decimal dilution method.

### 1.3 DNA preparation

A colony was suspended in 100µL of sterile water, or 1 mL of broth culture was centrifuged (13000  $\times$  g for 5 min), washed in sterile water, centrifuged again (13000  $\times$  g for 5 min) and suspended in 100µL of sterile water. And the InstaGene® lysis system according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) was used to extract DNA.

### 1.4 PCR detection of specific bacterial group (SporeTraQ™)

*Geobacillus stearothermophilus* , *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica* and *Thermoanaerobacterium* spp group were screened by PCR assay according to Prevost et al. (2010) after bacterial growth followed revivification performed at 55°C. The reverse primer sequence for *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* detection was modified to AGGCTATTCGCCTTTAAGAC (Sevenier et al., 2012). All amplifications were performed in a GeneAmp 9700 PCR system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

### 1.5 Identification of bacteria

Identification involved partial sequencing of the 16S rRNA coding region. For this, PCR was performed with primers FD1 and RD1 according to Weisburg et al. (1991). The amplicon was column-purified before sequencing. Sequencing was performed by Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany) according to Sanger's method. The primers used for sequencing were S6-16S (GTATTACCGCGGCTGCTG) and/or FD1. Longer sequences were obtained for *Thermoanaerobacterium* isolates with a second sequencing primer CCCCACCTTCCTCCGTG. Sequences were checked for quality and further compared against nucleotide databases (GenBank at NCBI) using MEGABLAST with RDP software (Cole et al., 2009).

16S rRNA coding sequences of 0.9 kb minimal length from isolated thermophilic anaerobes were used for sequence analysis and registered in GenBank under accession numbers JX984955 to JX984980. Type-strain sequences from the RDP database corresponded to: *Caldanaerobacter subterraneus* AE012979 (1527 bp), *Cr. subterraneus* AF212925 (1501 bp), *Caldanaerobius fijiensis* EF507903 (1354 bp), *Cs. polysaccharolyticus* U40229 (1360 bp), *Cs. zea* U75993 (1449 bp), *Gelria glutamica* AF321086 (1725 bp), *Moorella glycerini* U82327 (1513 bp), *M. thermoacetica* AY656675 (1430 bp), *M. thermoautotrophica* L09168 (1553 bp), *Tr. brockii* L09165 (1513 bp), *Tr. brockii* L09166 (1523 bp), *Tr. brockii* U14330

(1507 bp), *Tr. ethanolicus* L09162 (1740 bp), *Tr. italicus* AJ250846 (1480 bp), *Tr. mathranii* AY701758 (1404 bp), *Tr. mathranii* Y11279 (1507 bp), *Tr. pseudethanolicus* L09164 (1515 bp), *Tr. siderophilus* AF120479 (1561 bp), *Tr. sulfurigignens* AF234164 (1501 bp), *Tr. thermocopriae* L09167 (1522 bp), *Tr. uzonensis* EF530067 (1415 bp), *Tr. wiegelii* X92513 (1464 bp), *Tm aciditolerans* AY350594 (1442 bp), *Tm. aotearoense* X93359 (1478 bp), *Tm. saccharolyticum* L09169 1552 bp), *Tm. thermosaccharolyticum* AF247003 (1452 bp), *Tm. thermosaccharolyticum* EU563362 (1509 bp), *Tm. thermosaccharolyticum* CP002171 (1504 bp), *Tm. thermosaccharolyticum* HM585225 (1457 bp), *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes* L09171 1574 bp), *Tm. xylanolyticum* L09172, *Thermodesulfobium narugense* AB077817 (1363 bp).

These sequences were aligned using the CLUSTAL Omega program at EBI (Goujon et al., 2010). A dendrogram was built by the average distance method using percent identity on JalView software (Waterhouse et al., 2009). Distance expresses the average relative level of divergence between two aligned sequences. On the tree, branch lengths represent distances.

## 1.6 Spore suspensions

Thirty eight spores suspensions obtained with 36 strains were prepared according to French standard method NF T 72-231 (Afnor, 1988). Cell suspension (5 ml) following incubation at optimal temperature was inoculated onto agar media (140 mm diameter plate). Aerobic bacteria medium consisted of 10 g of beef extract, 2 g of yeast extract, 0.04 g of MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O, and 15 g of agar in 1 liter. Anaerobic bacteria medium consisted of 30 g of tryptone, 5 g of glucose, 20 g of yeast extract, 1 g of sodium thioglycolate, and 15 g of agar in 1 liter. Incubation was performed either 37 or 55°C depending on species and prolonged for 2 to 5 days for aerobic bacteria and 3 to 4 weeks under anaerobic conditions for others. Durations were adjusted by survey of percentage of spores, determined by microscopy observation. When 90% of spores were observed, harvest was decided. For meso-thermophilic species, optimal sporulation temperature was set by the highest quantity of spores obtained. For 2 strains (*B. coagulans* and *B. smithii*), the both temperatures were used. Spores were harvested by adding cold sterile distilled water onto agar and transferred into a sterile centrifugation tube. The spore suspension was centrifuged at 4000  $\times$  g for 20 min at 4°C and the pellet was washed three times following the same protocol, resuspended in 20 mL sterile distilled water, heat-treated, then stored at 4°C until analysis. Heat treatment was performed in a water bath for 10 min at 80°C for *Clostridium* and strict-mesophilic *Bacillus* spp and *Paenibacillus* spp

isolates and for 10 min at 100°C for other *Bacillus* spp, *Geobacillus stearothermophilus* , *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica*, *Thermoanaerobacter pseudothanicus* and *Thermoanaerobacterium* sp strains. The concentrated heat-treated suspensions exhibited up to  $10^8$  spores.ml<sup>-1</sup>, except for *Moorella*, *Thermoanaerobacter* and *Thermoanaerobacterium* sp. For the latter, spore suspension contained between  $10^6$  and  $10^7$  spores.ml<sup>-1</sup>.

### 1.7 Heat resistance of spore suspensions

100 µL capillary tubes (Ringcaps® Duran®) were filled with 50 µL of spore suspension in 0.2 M phosphate buffer pH7. Spores were heat-treated in a thermostated oil bath at temperatures ranging from 82°C to 132°C. For each spore suspension, heat resistance was evaluated on a temperature range of 9 to 13°C over a time range of 30 seconds to 6 hours. After heating, the tubes were immediately cooled in water. Then each end was opened aseptically and the suspension was flushed out with 3 mL of sterile tryptone-salt broth (AES Chemunex, Ivry-sur-Seine, France). Culturable cells were counted as described above. D values were estimated from linear portions of the log plots of surviving population vs heating time.  $\delta$  and p values were calculated according to the Weibull model modified by Mafart et al. (2002) in which  $\delta$  is the first reduction time that leads to a 10-fold reduction in surviving population, and p is the shape parameter. z values were determined by plotting D or  $\delta$  values vs temperature.

### 1.8 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using XLSTAT software (Addinsoft™, Paris, France). The correlation between the two heat resistance modeling methods was evaluated with a Pearson test. All tests were interpreted with a p-value of 0.05 (Tukey's honestly significant difference test).



### 3. Results and discussion

#### 3.1. Each spoilage case is mainly associated to a single species

A total of 455 samples of various recipes from 122 factories were collected over the course of this 10-year survey. An average of 26 vegetables, 17 ready-made meals and 5 samples containing fatty duck were examined each year.

During first years of study then several times during last years, several isolates were collected after enrichment from spoiled samples. Finally, in 99 spoiled samples, 2 to 5 different isolates were identified (Table 1). These 99 samples, with several identifications, among 462 cases, were representative of the food category variety [vegetables (55% of 99 selected samples and 56% of the 462 samples collection), ready-made meals containing meat (27% and 24%), ready-made meals containing seafood (3% and 3%) or other ready-made meal recipes (7% and 10%), and products containing fatty duck (8% and 7%)]. A single species was identified for 93% of these samples. This observation is consistent with the observation that 10% of samples in which bacterial DNA was directly extracted from spoiled food resulted in two mixed sequences on chromatogram (personal communication). For the 7 other samples in which different species were observed, only two species were found: *Geobacillus* was found with either *Thermoanaerobacterium* or *Bacillus*, while *Thermoanaerobacterium* was found with *Moorella* or *Thermoanaerobacter*. For analysis of the identification results, the 7 samples containing two identified species were considered as 14 different identifications. Taking into account the high percentage of samples with a single species identified, a single identification was performed for all other samples examined either if two different isolates were clearly detected.

For the five food categories, i.e. vegetables, ready-made meals based on meat, ready-made meals based on seafood, or other ready-made meal recipes, and products containing fatty duck, isolation resulted, respectively, in 258 (55%), 112 (24%), 15 (4%), 46 (10%) and 31 (7%) different identifications (Table 2). Thus, a total of 462 different identifications were considered in this study.

**Table 1** Number of different species identified in isolates recovered from spoiled canned food samples

Number of spoiled samples	Number of isolates identified from each sample	Number of different species from each sample
76	2	1
8	3	1
5	4	1
3	5	1
7	2	2

**Table 2** Species and number of each species of different isolates identified in the three global food categories

Species	Number of isolates	% of each genus in the food category	% of each species in the food category
<b>Vegetables</b>			
<i>M. thermoacetica /thermoautotrophica</i>	106	41.1	41.1
<i>G. stearothermophilus</i>	90		34.9
<i>G. caldxylosilyticus</i>	4	37.2	1.6
<i>Geobacillus</i> sp	1		<0.4
<i>G. thermoglucosidasius</i>	1		<0.4
<i>Tm. thermosaccharolyticum</i>	6		2.2
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	4	7.0	1.6
<i>Tm. aciditolerans</i>	6		2.2
<i>Tm. aciditolerans</i>	2		0.8
<i>B. licheniformis</i>	5		1.9
<i>B. smithii</i>	4		1.6
<i>B. coagulans</i>	3	5.8	1.2
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2		0.8
<i>B. thermoamylovorans</i>	1		<0.4
<i>Tr. mathranii/thermocopriae</i>	4	2.7	1.6
<i>Thermoanaerobacter</i> sp	3		1.2
<i>Ca. zaeae/fijiensis/polysaccharolyticus</i>	7	2.7	2.7
<i>A. contaminans</i>	5	1.9	1.9
<i>P. macerans</i>	2	0.8	0.8
<i>C. thermopalmarium/thermobutyricum</i>	1	<0.4	<0.4
<i>Ge. glutamica</i>	1	<0.4	<0.4
Total	258		

Species	Number of isolates	% of each genus in the food category	% of each species in the food category
<b>Ready-made meals</b>			
<i>M. thermoacetica /thermoautotrophica</i>	60	34.7	34.7
<i>G. stearothermophilus</i>	61		35.3
<i>G. debilis</i>	1	36.4	<0.6
<i>Geobacillus</i> sp	1		<0.6
<i>Tm. thermosaccharolyticum</i>	8		4.6
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp	6	9.2	3.5
<i>Tm. aciditolerans</i>	1		<0.6
<i>Tm. aotearoense</i>	1		<0.6
<i>B. coagulans</i>	6		3.5
<i>B. licheniformis</i>	3		1.7
<i>B. thermoamylovorans</i>	3	9.2	1.7
<i>B. smithii</i>	2		1.2
<i>B. amyloliquefaciens</i>	1		<0.6
<i>Bacillus</i> sp	1		<0.6
<i>Tr. thermohydrosulfuricus</i>	4		2.3
<i>Tr. mathranii/thermocopriae</i>	3	6.4	1.7
<i>Thermoanaerobacter</i> sp	4		2.3
<i>Ca. zeae/fijiensis/polysaccharolyticus</i>	2	1.2	1.2
<i>A. flavothermus</i>	3	1.7	1.7
<i>P. macerans</i>	1	1.2	<0.6
<i>Paenibacillus.</i> sp	1		<0.6
Total	173		
Species	Number of isolates	% of each genus in the food category	% of each species in the food category
<b>Products containing fatty duck</b>			
<i>M. thermoacetica /thermoautotrophica</i>	0	0	0
<i>G. stearothermophilus</i>	1	6.4	3.2
<i>G. pallidus</i>	1		3.2
<i>Tm. aotearoense</i>	5	38.7	16.1
<i>Tm. thermosaccharolyticum</i>	5		16.1
<i>Thermoanaerobactrium</i> sp	2		6.4
<i>B. coagulans</i>	4	16.1	12.9
<i>B. smithii</i>	1		3.2
<i>C. thermopalmarium / thermobutyricum</i>	11	35.5	35.5
<i>Thermoactinomyces</i> sp	1	3.2	3.2
Total	31		

Abbreviations: *A.*: Anoxybacillus, *B.*: Bacillus, *Ca.*: Caldanaerobius, *C.*: Clostridium, *Ge.*: Gelria, *G.*: Geobacillus, *M.*: Moorella, *P.*: Paenibacillus, *Tr.*: Thermoanaerobacter, *Tm.*: Thermoanaerobacterium

### 3.2. Phylogenetic relationship between canned-food isolated *Thermoanaerobacterium* sp. type *Thermoanaerobacterium* species and other thermophilic anaerobic sporeformers

A large fraction of the thermophilic anaerobes identified in this study belong to phylogenetic groups that were only recently described. Thus we analyzed the 16S rRNA gene sequences to investigate how the 29 isolates obtained here and labeled were related to previously-described *Thermoanaerobacterales*. This order gathers *Thermoanaerobacterium* (Liu et al., 1996; Can et al., 2001; Klubanov et al., 2007), *Thermoanaerobacter* (Fardeau et al., 2004; Carlier et al., 2006), *Caldanaerobius* (Lee et al., 2008), *Caldanaerobacter* (Fardeau et al., 2004), *Moorella* (Pierce et al., 2008) and *Gelria* (Plugge et al., 2002). We collected 32 sequences of type species and type strains from databases to anchor our analysis with (accession numbers starting by JX or as CTT). The percent of identity between each pair of sequence aligned varies between 36% and 100%.

As expected, the obtained phylogenetic tree exhibited clusters corresponding to the different genera (Figure 1). Six branches differed by a distance greater than 4. The strain *Thermodesulfobium narugense* clustered independently and was marked branch A. One group, labeled B, corresponded to *Thermoanaerobacter* and *Caldanaerobacter*. The genus *Moorella* was clearly separated into a branch labeled C. Two other clusters gathered the *Gelria* genus on one side (group D) and *Caldanaerobius* on the other (group E). The *Thermoanaerobacterium* group was independently clustered in a branch labeled F.

A strain referenced JX984955 originally identified from a partial 16S rRNA gene sequence as *Gelria glutamica* was the closest relative of the type strain, although at a distance of 0.44. Similarly, the isolates JX984962, JX984963 and JX984964 were clearly related to *M. thermoacetica* / *M. thermoautotrophica* type strains and separated from the species *M. glycerini* by a distance of 2.31. Four isolates, JX984972, JX984980, JX984966 and CTT4, were gatherable with the species *Ca. polysaccharolyticus* and *Ca. fijiensis* and were more distant to *Ca. zaeae*. These isolates were identified as *Ca. polysaccharolyticus*.

The isolates identified as *Thermoanaerobacterium* spp were partly separated. One cluster, labeled F1, exhibiting a maximal distance between all isolates of less than 0.96 gathered the species *Tm. aotearoense* *Tm. aciditolerans* and *Tm. thermosaccharolyticum*. However, within this cluster, three subgroups could be distinguished. An isolate named JX984977 that was related to this group but clustered individually was identified as *Thermoanaerobacterium* sp. A first subgroup was related to the reference strain *Tm. aotearoense* X93359. It gathered the isolates CTT5, JX984960, JX984975, JX984967, JX984969, JX984965 and JX984959. These

isolates were then classified as *Tm. aotearoense*. Another cluster corresponding to isolates JX984961, JX984957 and JX984970 was related to *Tm. Aciditolerans* type strain. A second subgroup clustering the isolates JX984956, JX984978, JX984979, JX984976, JX984958, JX984974, JX984971 and JX984968 was closely related to the *Tm. aciditolerans* type strain. Lastly, a cluster labeled F2, gathered isolates CTT3 and JX984973 with *Tm. saccharolyticum* at a distance of 1.11 from *Tm. thermosulfurigenes* and *Tm. xylanolyticum*.

### 3.3. Patterns of the bacterial species involved in high-temperature spoilage of canned food

Only two genera gathered 71% of bacteria identified from 55°C spoiled canned food samples. *Moorella* and *Geobacillus* were found respectively in 36% and 35% of samples (Table 2). Strikingly, these two genera were mainly represented by a single species: *G. stearothermophilus* represented 94% of *Geobacillus* spp and *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* 100% of *Moorella* spp. *M. thermoacetica* is an anaerobic sporeformer described as highly resistant to heat (Ashton and Bernard, 1992; Wagner and Wiegeler, 2008). Its growth in canned food is reported to result in strong acidification and can swelling (Ashton et al., 1992; Olson and Sorrells, 1992). Its optimal growth temperature is 55-60°C and it is considered as a model acetogen (Drake and Daniel, 2004). *G. stearothermophilus* is typically described as responsible for flat sour can spoilage (Olson et al., 1992; Moir et al., 2001; Tucker and Featherstone, 2011). The optimal growth temperature of the *Geobacillus* group is 55-65°C (Nazina et al., 2001).

*Thermoanaerobacterium* spp was identified in 8% of spoiled canned food samples. It shares similar physiological characteristics, such as anaerobic growth and an optimal growth temperature of around 63°C, to *M. thermoacetica*. Except for the species *Tm. thermosaccharolyticum* (formerly *Clostridium thermosaccharolyticum*), the other species were not previously described in food (Ashton et al., 1992; Chapman, 2001).

*Bacillus* spp was identified in 9% of spoiled samples. *B. coagulans* was the most frequent of the 7 different *Bacillus* species observed, while *B. smithii* and *B. licheniformis* were the two other species frequently detected. *B. coagulans* is commonly involved in the spoilage of moderately-acid canned vegetables like tomato products (Thompson, 1981; Hanlin, 1998; Moir et al., 2001; Tucker and Featherstone, 2011) and in other canned vegetables (Matsuda et al., 1985a; Oomes et al., 2007), and is acid-tolerant. *B. licheniformis* is often isolated in spoiled canned food (Anatskaya and Efimova, 1978; Chang and Lee, 1982; Matsuda et al., 1985b) and in the dairy industry (Anatskaya et al., 1978; Hanlin, 1998; Scheldeman et al.,

2005), whereas *B. smithii* had never previously been isolated from canned food and only once in food (Röling et al., 2001).

Other individual genera represented less than 5% of spoilage cases. The lowest frequencies of detection corresponded to *Caldanaerobius* spp, *Gelria glutamica*, *Anoxybacillus* spp, *Paenibacillus* spp, *Thermoanaerobacter* spp, *Clostridium thermopalmarium* / *thermobutyricum*, *Thermoactinomyces* sp and several species of *Geobacillus* other than *stearothermophilus*. To our knowledge, *Caldanaerobius* spp and *Gelria glutamica* have never been previously described as canned food contaminants. *Anoxybacillus contaminans* has been described in food gelatin batches (De Clerck et al., 2004) while *Anoxybacillus flavithermus* has been described in heat-processed dairy products and biofilms from food processing environments (Rueckert et al., 2005; Burgess et al., 2009; Postollec et al., 2012). *Paenibacillus* species are routinely found in low-acid canned products or dairy products (Anatskaya et al., 1978; Casadei et al., 2000). Several species of *Thermoanaerobacter* were identified from hot environments (Wagner et al., 2008). The biochemical characteristics and phylogenetic relationship of *Thermoanaerobacter* isolates from canning factories was investigated by Carlier and Bedora-Faure (2006) who proposed a new subspecies, *Thermoanaerobacter mathranii* subsp. *alimentarius*. *Clostridium thermopalmarium* / *thermobutyricum* was the only *Clostridium* species identified in our study. *C. thermopalmarium*, originally described from palm wine in Senegal (Soh et al., 1991), is moderately thermophilic with an optimal growth temperature of 50-55°C. It is genetically close to *C. thermobutyricum*, but with distinct physiological traits (Wiegel et al., 1981). This species was identified exclusively in products containing fatty duck. It represented the main bacterium involved in this spoilage food category and was never isolated in other food categories.

The origin of thermophilic anaerobes like *Moorella* spp, *Thermoanaerobacterium* spp and *Thermoanaerobacter* spp, which caused more than half of can spoilage cases in our study, is usually hot environments like geothermal hot springs and hydrothermal vents or sometimes warm environments like compost and manure (Wagner et al., 2008). For Presland et al. (2004), only *Geobacillus* and *Bacillus* aerobic bacteria and *Moorella* anaerobic sporeformers were cited as thermophiles involved in canned food spoilage. *M. thermoacetica* has occasionally been isolated in canned vegetables (Carlier et al., 2006) or in specific spoiled food products such as canned coffee and “shiruko” (Matsuda et al., 1982). Dotzauer et al., (2002) identified *Thermoanaerobacterium* and *Thermoanaerobacter* and not *Moorella*, but the occurrence of the different genera in their thermophilic anaerobes groups contrasts with

our results. It could be due to their agar medium on which isolates from this genus was unable to grow. We consider especially difficult to isolate these genus because it requires special agar not used in bibliography and long duration of incubation rarely used for spore-forming bacteria culture. In addition, the genus *Desulfuromaculum* was not isolated in our study whereas it was described as a spoilage bacterium of canned foods, such as spoiled canned milk-containing 'shiruko' coffee or low-acid canned vegetables such as sweet corn (Matsuda et al., 1982; Chapman, 2001; Sperber and Doyle 2009).

### 3.4. Food category breakdown of the occurrence of the main bacterial groups

Differences in the patterns of identified isolates according to product category were observed (Table 3). In spoiled vegetables and ready-made meals, the same dominant species, *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica*, were identified. This correlation between vegetables and ready-made meals could be due to the contribution of vegetables and other plant-based ingredients such as spices which are frequent sources of contamination (Bolton, 2001; Witkowska et al., 2011). This predominance of both species was not observed in the products containing fatty duck, in which the main spoilage species were *Thermoanaerobacterium* and *Clostridium thermopalmarium* / *thermobutyricum*. This difference could be related to the product category (presence of high concentrations of lipids that could be limiting for spore germination (Dallyn and Everton, 1970; Lekogo et al., 2010)) or to a low level of thermal treatments (products containing fatty duck present  $F_0$  values lower than 5 min; Table 3). The raw materials used were also very different (only fatty liver or duck meat and fat), although spices (usually black pepper) could be a source of the same bacterial species as in vegetables and ready-made meals. The other main species detected were *Thermoanaerobacterium* spp and *Bacillus* spp. The species distribution is similar between the five food categories, with *Tm. thermosaccharolyticum* one of the most represented within the genus. Dotzauer et al. (2002) observed a similar species distribution, with few *Thermoanaerobacterium* sp and a majority of *Tm. thermosaccharolyticum*.

A deeper analysis was made of the relationship between spoiled canned food products and the bacteria identified by considering recipe and  $F_0$  for each product category (Table 3).

In vegetable-based spoiled canned food, *G. stearothermophilus* was isolated from 18 out of 22 different recipes, whereas *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* was isolated from 11 different recipes. *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* was mainly identified from green peas (40% of *Moorella* spoilage cases) and green peas with carrots (22% of *Moorella* spoilage



cases). *Moorella* represented more than two thirds of spoilage bacteria identified from these products. In other vegetable-based recipes, *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* was frequently detected in mushrooms, green beans, spinach and mixed vegetables. *G. stearothermophilus* spoilage was widespread among the different recipes: 11 vegetable-based recipes resulted in at least four (4.5%) independent detections of the bacterium. The recipes that most frequently led to *G. stearothermophilus* development were mixed vegetables, followed by green beans, green peas, and then sweet corn. Green beans, green peas and sweet corn are the leading canned vegetables by volume produced in France (Bernardin et al., 2010). However, *G. stearothermophilus* alone accounted for more than 40% of spoilage cases of green beans and more than 80% of spoilage cases of sweet corn. As *G. stearothermophilus* was found in various recipes containing a single vegetable, it was logically also found in mixes of these products. *G. stearothermophilus* was isolated from canned peas by Georgescu and Bugulescu (1969), from spoiled canned tomatoes by Hernandez and Feria (1971), and from spoiled canned green beans by Baumgart et al. (1983). For other bacteria identified from spoiled vegetable-based canned food, we found no clear distribution pattern according to recipe, except that *A. contaminans* was identified exclusively in soups.

In meat-based ready-made meals, the difference between recipe distribution of spoilage caused by *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* or *G. stearothermophilus* was less marked than in vegetables. *G. stearothermophilus* was mainly found in meat-based recipes and cassoulet, while *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* was mainly found in poultry recipes, sausages-and-lentils, and cottage pie. Its presence in cottage pie may be due to *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* contamination of the heavily processed potatoes flakes widely used for industrial mashed potato preparation. However, the high frequency of *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* in the sausages-and-lentils recipe could not be directly related to lentil contamination, as we found no cases of caused *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* spoilage of lentils in brine. For other bacteria detected as spoilage agents of ready-made canned meals, the only salient feature was *B. coagulans* mainly identified in cassoulet. *G. stearothermophilus* was again the most widespread species. In other ready-made meals as well as in quenelles and dairy dessert recipes. *G. stearothermophilus* was often incriminated in the contamination of powdered milk and dehydrated ingredients (Rueckert et al., 2005; Postollec et al., 2012). Lastly, *A. flavothermus* was exclusively identified from spoiled fish soup.



In products containing fatty duck, *Thermoanaerobacterium* sp was found mainly in foie gras and in fat-preserved duck, whereas *C. thermopalmarium* / *thermobutyricum* was only found in foie gras.

Based on this analysis, several bacterial groups of spore-formers could thus be singled out as candidate for spoilage indicators in different food categories, in order to establish microbial criteria or minimum processing parameters. These indicators depend on both the ingredients used and the level of heat treatment applied. For canned vegetables and meat-based ready-made meals heat-treated according to traditional process with  $F_0$  values above 20 min, the general indicators are *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica*. *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* emerges as a specifically relevant indicator for vegetable mixes containing peas containing, while *G. stearothermophilus* is specific to dairy-derived products. *Anoxybacillus* spp is relevant for soups, and to a lesser extent *B. coagulans* is relevant for cassoulet and foie gras. For products containing fatty duck that are treated with  $F_0$  values below 5 min, both *Thermoanaerobacterium* sp and *C. thermopalmarium* / *thermobutyricum* are the most suitable hygienic indicators.

**Table 3** Spoiled food samples examined by category and occurrence of the main bacterial groups identified by canned food category, recipe and corresponding routine average Fo<sup>a</sup> used in canneries

Product	Number of samples	Routine F <sub>o</sub> (min)	<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermo-thermotrophica</i>	<i>G. stearo-thermophilus</i>	<i>Thermoanaerobacterium</i> spp	<i>B. coagulans</i>	<i>C. thermophilum</i>	<i>Anoxybacillus</i> spp
<b>Vegetables</b>								
Peas	65	>20	43	11	2			
Mixed vegetables	31	>20	7	19	2			
Peas - carrots	30	>20	23	4	1		1	
Green beans	27	5-20	8	11	2			
Mushrooms	21	>20	8	5	3			
Vegetable soup	14	>20	2	5	1			5
Sweetcorn	11	>20	2	9				
Spinach	7	>20	3		1			
Flageolet beans	5	5-20		4				
White beans	4	nc <sup>c</sup>		4				
Other recipes <sup>b</sup>	4 or less each	nc	0 or 1	3 or less each	0 or 1	3		
			Subtotal		258			
<b>Ready-made meals</b>								
<b>- Meat-based meals</b>								
Red meat	21	5-20	3	9	2	1		
Cassoulet	17	5-20	3	6	2	3		
Poultry	11	5-20	8	3				
Cottage pie	10	>20	7	1	1			
Sausages-lentils	8	>20	7					
Snails	6	>20	2	1				
Couscous	4	nc	4					
Other recipes <sup>d</sup>	<4	nc	2 or less each	0 or 1	2 or less each	2		
			Subtotal		112			
<b>- Other types</b>								
Ravioli	11	<20	5	6				
Quenelles	10	5-20		9				
Dairy products	9	5-20	1	6				
Sauce	6	variable	1	1	3			
Other recipes <sup>e</sup>	<5	nc	2 or less each	1 or 2	0			
			Subtotal		46			
<b>- Seafood-based ready-made meals</b>								
Fish soup	4	nc						3
Other recipes <sup>f</sup>	<3	nc	1 or 0	3 or less each	1 or 0			
			Subtotal		15			
<b>Products containing fatty duck</b>								
Foie gras	24	<5			7	4	11	
Fat-preserved duck	7	<5	1		5			
			Subtotal		31			
<b>Total</b>	<b>462</b>		<b>152</b>	<b>166</b>	<b>46</b>	<b>13</b>	<b>12</b>	<b>8</b>

<sup>a</sup> F<sub>o</sub>: Sterilization value achieved at cold point of Low-Acid Canned Foods calculated with reference temperature 121,1°C and z = 10°C; values edited only for products analyzed more than 5 times per recipe; <sup>b</sup> lettuce, lentils, potatoes, artichokes, chestnuts, leeks, carrots, red kidney beans, coral lentils,

soy, miscellaneous;<sup>c</sup> not communicated; <sup>d</sup> duck, terrine, meatballs, stuffed cabbage, paella, paté, cocktail sausages, miscellaneous; <sup>e</sup> garnish, rice, miscellaneous; <sup>f</sup> bisque, hake, fish pie, cod, miscellaneous; Abbreviations: *B.*: *Bacillus*, *C.*: *Clostridium*, *G.*: *Geobacillus*, *M.*: *Moorella*

### 3.5. Heat resistance parameters

As expected, the canned-food  $F_0$ -value observed in industry was strongly related to heat resistance of the strains isolated. The most heat-resistant species, *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica*, was isolated from canned products treated at  $F_0 > 20$  min. *G. stearothermophilus* was regularly isolated from products treated at moderate or high heat levels ( $F_0$  between 5 to 20 min and  $F_0$  above 20 min). The isolation conditions of *B. coagulans* strains proved the most significant, yielding a strict correlation between heat resistance level and  $F_0$ -value applied to the canned products. The less heat-resistant strain (3105 044) was isolated from a pasteurization process, the next-least-heat-resistant strain (3105 018) from a canned foie gras ( $F_0 < 5$  min) and the third least-heat-resistant strain (3105 018) from a cassoulet treated at  $5 < F_0 < 20$  min.

However, our data do not explain why *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* was not isolated from spoiled products that were treated at  $F_0$ -values too low to inactivate its spores. The most realistic hypothesis is that the low growth rate of this species favors competing bacteria that were faster to spoil the product as they were not destroyed by the low-level heat treatment.

**Table 4** Heat resistance parameters of species isolated in spoiled canned food

Species	Strain	Growth and sporulation temperature <sup>a</sup> (C°)	Calculated temperature (°C) for D = 10 min	Z <sub>loglinear</sub> values (°C)	Z <sub>Weibull</sub> values (°C)
<i>M. thermoacetica</i>	1901 058	<u>55</u>	125.9	7.9	8.0
<i>M. thermoacetica</i>	1901 053	<u>55</u>	125.6	8.2	8.6
<i>M. thermoacetica</i>	1901 020	<u>55</u>	125.3	6.1	6.5
<i>G. stearothermophilus</i>	2804 168	<u>55</u>	115.6	7.4	7.2
<i>G. stearothermophilus</i>	2804 138	<u>55</u>	114.8	7.6	7.8
<i>G. stearothermophilus</i>	2804 173	<u>55</u>	113.6	9.4	8.7
<i>Ca. zeae</i> / <i>figensis</i> / <i>polysaccharolyticus</i>	2503 005	<u>55</u>	118.1	6.9	7.0
<i>Tm. aotearoense</i>	2503 020	<u>37-55</u>	116.5	7.1	7.7
<i>Tm. aotearoense</i>	2501 001	<u>37-55</u>	116.3	7.4	7.5
<i>Tm. thermosaccharolyticum</i>	2506 011	<u>55</u>	116.4	5.8	5.8
<i>Tr. pseudothanicus</i>	2510 001	<u>55</u>	109.1	6.9	6.9
<i>B. smithii</i>	3108 003	<u>37-55</u>	113.1	6.1	6.3
<i>B. smithii</i>	3108 010	<u>37-55</u>	109.6	7.5	7.2
<i>B. smithii</i>	3108 021	<u>37-55</u>	105.0	7.5	7.8
<i>C. thermopalmarium</i> / <i>thermobutyricum</i>	3216 001	<u>55</u>	108.3	6.4	6.2
<i>Paenibacillus sp</i>	2911 002	<u>37</u>	108.0	6.2	6.3
<i>Paenibacillus sp</i>	2901 020	<u>37</u>	102.3	8.0	8.2
<i>Paenibacillus sp</i>	2901 002	<u>37</u>	101.4	7.5	7.7
<i>B. subtilis</i>	3111 037	<u>37</u>	108.0	8.9	9.0
<i>B. subtilis</i>	3111 002	<u>37</u>	103.2	10.1	10.0
<i>B. coagulans</i>	3105 032	<u>37-55</u>	106.8	6.2	6.4
<i>B. coagulans</i>	3105 018	<u>37-55</u>	99.3	7.5	7.8
<i>B. coagulans</i>	3105 044	<u>37-55</u>	98.6	8.5	8.4
<i>B. licheniformis</i>	3107 028	<u>37-55</u>	102.4	8.5	9.2
<i>B. licheniformis</i>	3107 043	<u>37-55</u>	97.7	8.0	6.7
<i>B. licheniformis</i>	3107 017	<u>37-55</u>	97.1	6.7	6.9
<i>B. licheniformis</i>	3107 017	<u>37-55</u>	96.7	8.7	8.6
<i>B. licheniformis</i>	3107 022	<u>37-55</u>	94.9	8.1	8.1
<i>C. haemolyticum</i>	3207 002	<u>37</u>	100.6	8.2	9.2
<i>C. sporogenes</i>	3222 002	<u>37</u>	100.1	7.8	7.7
<i>C. sporogenes</i>	3222 001	<u>37</u>	99.2	7.4	7.5
<i>C. sporogenes</i>	3213 005	<u>37</u>	98.3	6.6	6.6
<i>P. macerans</i>	2903 017	<u>37</u>	99.4	7.8	7.6
<i>P. macerans</i>	2903 006	<u>37</u>	99.2	7.6	7.2
<i>P. polymyxa</i>	2904 003	<u>37</u>	90.3	7.8	8.0
<i>P. polymyxa</i>	2904 005	<u>37</u>	89.0	7.9	7.9
<i>C. novii</i>	3210 016	<u>37</u>	84.7	7.9	8.3

<sup>a</sup> underlined : sporulation temperature; Abbreviations: *A.*: *Anoxybacillus*, *B.*: *Bacillus*, *Ca.*: *Caldanaerobius*, *C.*: *Clostridium*, *G.*: *Geobacillus*, *M.*: *Moorella*, *P.*: *Paenibacillus*, *Tr.*: *Thermoanaerobacter*, *Tm.*: *Thermoanaerobacterium*

## **Conclusion**

This paper reports results from a long-term ten-year survey of the causes of food spoilage in high-temperate heat-treated canned foods in France. With these 462 isolates from spoiled canned food of 122 canneries, the study enriches previous data on species isolated from spoiled LACF products (Landry et al., 2001; Tucker and Featherstone, 2011). The spoilage bacteria involved are highly heat-resistant, thermophilic and non-pathogenic with 2 species representing 69% of spoilage cases. Our results confirmed that thermophilic bacteria are good indicators of food hygiene, as highlighted by Burgess (Burgess et al., 2010). Adapted bacterial indicator groups for canned food spoilage were proposed. These data and more specifically the heat resistance parameters determined for strains isolated from industrial food processes, bring valuable insights for the management of processing line contamination and for the calculation of scheduled sterilization heat treatments. Screening for these indicators in raw materials, ingredients and samples from processing lines could help single out several contamination locations in canneries for a better hygiene control.

Better control of thermophilic spores by proper cleaning of processing lines and higher standards of quality for raw materials and the determination of the elevated-temperature stability of LACF should help improve food safety monitoring: any increase in 55°C-non-stability frequency should therefore be considered as a warning sign that hygiene conditions on processing lines are degraded for either thermophilic spoilage and mesophilic pathogen spore-forming bacteria. In this purpose, it should be necessary to determine precisely the process steps where these species proliferated and to know the genetic and physiologic diversity of strains to link raw material, multiplication area and spoiled products.

## **Acknowledgments**

This work was supported by FranceAgriMer. We thank the French canned food manufacturers that kindly collected the spoiled samples.

## **Bibliography**

Afnor. 1988. Détermination de l'activité sporicide - Méthode par filtration sur membranes., Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau, NF T72-231. Afnor, Paris.

- Afnor. 1997a. Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés - Méthode de référence, Microbiologie des aliments, NF V08-401. Afnor, Paris.
- Afnor. 1997b. Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés - Méthode de routine, Microbiologie des aliments, NF V08-408. Afnor, Paris.
- Anatskaya, A.G., Efimova, V.A., 1978. Spoilage of evaporated sterilized milk by sporeforming bacteria. XX International Dairy Congress, 739-740.
- 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.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P., 2012. Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH. Food Microbiology 30, 29-36.
- Baumgart, J., Hinrichs, M., Weber, B., Kuepper, A., 1983. Spoilage and blowing of canned green beans by *Bacillus stearothermophilus*. Chemie Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel 8, 7-10.
- Bender, G.R., Marquis, R.E. 1985. Spore heat resistance and specific mineralization. Applied and Environmental Microbiology 50, 1414-1421.
- Bernardin, A., Pierron, D., Emerit, M., Rahmani, M.A., 2010. Les légumes en conserve et surgelés en 2010 - Bilan économique. Unilet, Paris. 27.
- Bolton, L., 2001. Variety is the spice of life: a microbiological perspective. Food Safety Express 2, 17.
- Bouvier, Courtois, Gantois, Niel, Richard, Sanalie, Sansoulet., 1982. Défauts et altération s des conserves - Nature et origines. 1st ed. AFNOR, Paris.
- Burgess, S.A., Brooks, J.D., Rakonjac, J., Walker, K.M., Flint, S.H. 2009. The formation of spores in biofilms of *Anoxybacillus flavithermus*. Journal of Applied Microbiology 107, 1012-1018.
- 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.
- Byrer, D.E., Rainey, F.A., Wiegel, J., 2000. Novel strains of *Moorella thermoacetica* form unusually heat-resistant spores. Archives of Microbiology 174, 334-339.

- Can, I.K.O., Stroot, P.G., Mackie, K.R., White, B.A. and Mackie, R.I. 2001. Characterization of two novel saccharolytic, anaerobic thermophiles, *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* sp. nov. and *Thermoanaerobacterium zae* sp. nov., and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 293-302.
- 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.
- Carlier, J.-P., Bonne, I., and 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
- Casadei, M., Ingram, R., Skinner, R., Gaze, J., 2000. Heat resistance of *Paenibacillus polymyxa* in relation to pH and acidulants. Journal of Applied Microbiology 89, 801-806.
- Chang, P.P., Lee, C.M., 1982. Spoilage bacteria in canned foods. Food Industry Research and Development Institute 65, 1-12.
- Chapman, B., 2001. Anaerobic sporeforming rods. In: Group, A.I.F.M., (Ed.), Spoilage of processed Foods: Causes and diagnosis. Australian Institute of Food Science and technology Incorporated, Waterloo DC. 295-306.
- Codex alimentarius, 1979. Code of hygienic practice for low acid and acidified low acid canned foods, CAC/RCP, vol. 23 - rev 2 (1993). Codex alimentarius.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., Mc Garrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2009. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Research 37, 141-145.
- CTCPA. 2012a. GBPH Fabrication de conserves de végétaux appertisés. Direction des Journaux Officiels 1st edition - in press.
- CTCPA. 2012b. GBPH Fabrication de plats cuisinés appertisés et de conserves de viande. Direction des Journaux Officiels 1st edition - n° 5954, in press.
- Dallyn, H., Everton, J.R., 1970. Observations on the sporicidal action of vegetable oils used in fish canning. Journal of Applied Bacteriology 33, 603-608.

- De Clerck, E., Rodriguez-Diaz, M., Vanhoutte, T., Heyrman, J., Logan, N.A., De Vos, P., 2004. *Anoxybacillus contaminans* sp. nov. and *Bacillus gelatini* sp. nov., isolated from contaminated gelatin batches. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 941-946.
- Dotzauer, C., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F., 2002. Occurrence and detection of *Thermoanaerobacterium* and *Thermoanaerobacter* in canned food. *Food Technology and Biotechnology* 40, 21-26.
- Drake, H.L., Daniel, S.L., 2004. Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Research in Microbiology* 155, 869-883.
- Fardeau, M.L., Bonilla Salinas, M., L'Haridon, S., Jeanthon, C., Verhe, F., Cayol, J.L., Patel, B.K.C., Garcia, J.L., and Ollivier, B., 2004. Isolation from oil reservoirs of novel thermophilic anaerobes phylogenetically related to *Thermoanaerobacter subterraneus*: reassignment of *T. subterraneus*, *Thermoanaerobacter yonseiensis*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* and *Carboxydobrachium pacificum* to *Caldanaerobacter subterraneus* gen. nov., sp. nov., comb. nov. as four novel subspecies." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 467-474
- Georgescu, A.C., Bugulescu, M., 1969. Thermophilic organisms in insufficiently sterilized canned peas. *Industria Alimentara* 20, 251-253.
- Goujon, M., Mc William, H., Li, W., Valentin, F., Squizzato, S., Paern, J., Lopez, R., 2010. A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* 1, W695–W699
- Hanlin, J.H., 1998. Spoilage of acidic products by *Bacillus* species. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 18, 655-659.
- Hernandez, E., Feria, M.A., 1971. Typical flora of spoiled canned tomatoes. Thermal death times. *Revista de Agroquimica y Tecnologia de Alimentos* 11, 126-131.
- Jenson, I., Jensen, N. M. H., 2001. Gram positive aerobic sporeforming rods. In: Group, A.I.F.M., (Ed.), *Spoilage of processed Foods: Causes and diagnosis*. Australian Institute of Food Science and Technology Incorporated, Waterloo DC. 271-294.
- Kublanov, I.V., Prokofeva, M.I., Kostrikina, N.A., Kolganova, T.V., Tourova, T.P., Wiegel, J., and Bonch-Osmolovskaya, E.A. 2007. *Thermoanaerobacterium aciditolerans* sp. nov., a moderate thermoacidophile from a Kamchatka hot spring." *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 260-264



Landry, W.L., Schwab, A.H., Lancette, G.A., 2001. Examination of Canned Foods Chapter 21A [Online]. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109398.htm>).

Lee, Y.-J., Mackie, R.I., Cann, I.K., and Wiegel, J. 2008 Description of *Caldanaerobius fijiensis* gen. nov., sp. nov., an inulin-degrading, ethanol-producing, thermophilic bacterium from a Fijian hot spring sediment, and reclassification of *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum* and *Thermoanaerobacterium zae* as *Caldanaerobius polysaccharolyticus* comb. nov. and *Caldanaerobius zae* comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58, 666-670.

Leguerinel, I., Couvert, O., Mafart, P., 2007. Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. International Journal of Food Microbiology 114, 100-104.

Lekogo, B.M., Coroller, L., Mathot, A.G., Mafart, P., Leguerinel, I., 2010. Modelling the influence of palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids on apparent heat resistance of spores of *Bacillus cereus* NTCC 11145 and *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3. International Journal of Food Microbiology 141, 242-247.

Liu, S.Y., Rainey, F.A., Morgan, H.W., Mayer, F., and Wiegel, J. 1996. *Thermoanaerobacterium aotearoense* sp. nov., a slightly acidophilic, anaerobic thermophile isolated from various hot springs in New Zealand, and emendation of the genus *Thermoanaerobacterium*. International Journal of Systematic of Bacteriology 46, 388-396

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.

Matsuda, N., Komaki, M., Ichikawa, R., Gotoh, S., 1985a. Aerobic and facultative anaerobic spore-forming bacteria isolated from spoiled canned foods. Journal of Japanese Society of Food Science and Technology 32, 399-406.

Matsuda, N., Komaki, M., Ichikawa, R., Gotoh, S., 1985b. Cause of microbial spoilage of canned foods analysed during 1968-1980. Journal of Japanese Society of Food Science and Technology 32, 444-449.

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.

- Moir, C.J., Murell, W.G., Richardson, K.C., Board, P.W., 2001. Commercially sterile foods. In: Group, A.I.F.M., (Ed.), Spoilage of processed Foods: Causes and diagnosis. Australian Institute of Food Science and Technology Incorporated, Waterloo DC. 101-112.
- 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.
- 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.
- Olson, K.E., Sorrells, K.M., 1992. Thermophilic flat sour sporeformers. In: Vanderzantz, C., Splittstoesser, D.F., (Eds.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington DC. 299-308.
- 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.
- Pflug, I.J., Davidson, P.M., Holcomb, R.G., 1981. Incidence of canned food spoilage at the retail level. Journal of Food Protection 44, 682-685.
- 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., and Ragsdale, S.W. 2008. The complete genome sequence of *Moorella thermoacetica* (f. *Clostridium thermoaceticum*) Environmental Microbiology 10, 2550-2573
- Plugge, C.M., Balk, M., Zoetendal, E.G., and Stams, A.J.M., 2002 *Gelria glutamica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, obligately syntrophic, glutamate-degrading anaerobe. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 52, 401-407.

- Postollec, F., Mathot, A.G., Bernard, M., Divanac'h, M.L., Pavan, S., Sohier, D., 2012. Tracking spore-forming bacteria in food: From natural biodiversity to selection by processes. *International Journal of Food Microbiology* 158, 1-8.
- Presland, F. 2004. Microbial threats in canned foods. *International Food Hygiene* 15, 14-15.
- Prevost, S., André, S., Remize, F., 2010. PCR Detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage. *Current Microbiology* 61, 525-533.
- Richardson, K.C., 1972. Microbial spoilage in Australian canned foods, 1955-68. *Food Technology in Australia* 24, 106-107.
- Röling, W.F., Kerler, J., Braster, M., Apriyantono, A., Stam, H., van Verseveld, H.W., 2001. Microorganisms with a taste for vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian vanilla curing. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1995-2003.
- Rueckert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W. 2005. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1246-1255.
- Sala, F., Abarz, P., Palop, A., Raso, J., Condon, S., 1997. Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus subtilis* at different pH values. *Journal of Food Protection* 58, 239-243.
- 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.
- 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.
- Soh, A.L., Ralambotiana, H., Ollivier, B., Prensier, G., Tine, E., Garcia, J.L., 1991. *Clostridium thermopalmarium* sp. nov., a moderately thermophilic butyrate-producing bacterium isolated from palm wine in Senegal. *Systemic and Applied Microbiology* 14, 135-139.
- Sperber, W.H., Doyle, M.P., 2009 *Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages*. New York, NY; Springer Science 367pp.
- Stumbo, C.R. 1973. *Thermobacteriology in food processing*. 2d ed. Academic press, New York.

- Thompson, P.J., 1981. Thermophilic organisms involved in food spoilage: aciduric flat-sour sporeforming aerobes. *Journal of Food Protection* 44, 154-156.
- Tucker, G., Featherstone, S., 2011. *Essentials of thermal processing*, Wiley-Backwell, London.
- Vicini, E., 1986. A survey of the causes of microbial spoilage in tomato products during 1969-1985. *Industrial Conserve* 61, 338-345.
- Wagner, I.D., Wiegel, J. 2008. Diversity of thermophilic anaerobes. *Annals of the New York Academy of Sciences* Mar, 1-43.
- Waterhouse, A.M., Procter, J.B., Martin, D.M.A., Clamp, M., Barton, G.J., 2009. Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25, 1189-1191.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697-703.
- 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.
- Witkowska, A.M., Hickey, D.K., Alonso-Gomez, M., Wilkinson, M.G., 2011. The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control* 22, 616-625.
- Xezones, H., Segmiller, J.L., Hutchings, I.J., 1965. Processing requirements for a heat-tolerant anaerobe. *Food Technology* 19, 1001-1002.

## 5.1.2. Caractérisation de la flore entrant dans des conserveries de légumes (article 3)

### Contexte

Lors de la gestion de cas de conserves non stables, de nombreuses discussions ont eu lieu afin de tenter de déterminer l'origine des altérations. Si plusieurs origines ont pu être imaginées voire vérifiées comme des traitements thermiques insuffisants, des points de multiplication sur des étapes de process (Cf. paragraphe 5.2.) ou des cycles de nettoyages-désinfections non optimisés (Cf. paragraphe 5.3.), la contamination initiale en spores thermophiles n'avait jamais été étudiée car cela nécessite une organisation lourde au niveau du prélèvement de légumes frais entrants dans les usines. Dans le même temps, le laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses de Maisons-Alfort (Plateforme IdentityPath) souhaitait valider son outil de détection de *C. botulinum* dans les légumes alimentant les lignes de conserves. Afin d'optimiser des campagnes de prélèvements au cours de périodes intensives de production, ces 2 thématiques ont été regroupées.

### Protocole

Il a donc été prévu lors de 2 campagnes de récolte / production (carottes en juin et juillet et haricots verts en août et octobre) des séries de prélèvements dans un maximum d'usines françaises réparties sur tout le territoire métropolitain représentant l'ensemble des bassins de production (Nord, Bretagne, Centre et Sud-Ouest). Un ensemble de 473 échantillons ont été analysés par dénombrement de la flore thermophile sporulante selon la méthode normée (NF V 08-602) et selon une méthode interne au CTCPA spécifique aux HHRS (High Heat Resistant Spores) ou THT en français (Thermophiles Hautement Thermorésistants) tels que les genres *Moorella*, *Geobacillus* et *Thermoanaerobacterium*. Les THT ont été spécifiquement suivis car ce sont les germes les plus difficiles à maîtriser par le traitement thermique de stérilisation du fait de leur haute résistance thermique comme cela a été démontré lors de la caractérisation de la flore d'altération des conserves (Cf. paragraphe 5.1.1.). En parallèle, une détection dans 10 g de légumes frais de *C. botulinum* et des spores anaérobies thermophiles a été menée à l'aide d'une première étape d'enrichissement suivie d'une deuxième étape de détection par méthode moléculaire (SporeTraQ™ pour les THT et BoNT GeneDisc® pour *C. botulinum*).

## Résultats

Comme attendu, la contamination initiale en *C. botulinum* a été très faible (2 positifs / 316 échantillons) et uniquement dans des légumes frais non parés. Dès que les légumes ont été préparés par différentes étapes de parage (élimination des parties non comestibles), plus aucune contamination en pathogène n'a été observée. Au niveau des THT, la prévalence varie de 1,6% pour *Moorella* dans les haricots verts à 8,6% pour *G. stearothermophilus* ou *Thermoanaerobacterium* dans les carottes. Comme pour *C. botulinum*, les étapes de parage en amont des zones de prolifération (i.e. zone post-blanchiment) conduisent à une forte diminution de la contamination en spores thermophiles, en moyenne de 1,5 log ufc.g<sup>-1</sup>.

## Valorisation

Cette étude a permis de confirmer, comme dans d'autres matrices précédemment étudiées, que l'occurrence de *C. botulinum* était très faible dans les légumes frais entrant dans la composition de conserves. De plus, elle a permis pour la première fois de qualifier sur une campagne complète, la contamination en spores thermophiles entrant dans les lignes de productions des conserveries. Et même si l'apport en spores par les matières premières était attendu, c'est le niveau de la charge entrante qui a surpris même si les étapes de parage sont un premier crible efficace. Pour les industriels, cette étude a permis de mettre en évidence que la lutte contre ces germes doit être de tous les instants car l'apport étant quasiment en continu, le moindre relâchement peut conduire à une explosion de la population sur la ligne de production.

Ce travail a été publié dans International Journal of Food Microbiology en 2012.

## Prevalence of *Clostridium botulinum* and thermophilic heat-resistant spores in raw carrots and green beans used in French canning industry

V. Sevenier<sup>a,1</sup>, S. Delannoy<sup>b</sup>, S. André<sup>a</sup>, P. Fach<sup>b</sup>, F. Remize<sup>a,\*2</sup>

International Journal of Food Microbiology (2012), 155 263–268

<sup>a</sup> CTCPA Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles, Site Agroparc, BP 21203, F-84911 Avignon cedex 9, France

<sup>b</sup> ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety), Food Safety Laboratory, 23 Av du Général De Gaulle, F-94706 Maisons-Alfort, France

<sup>1</sup> Present address: EPLEA Louis Giraud, BP274-Serres, F-84208 Carpentras cedex, France.

<sup>\*2</sup> Corresponding author at: ESIROI — Université de La Réunion, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et des Sciences des Aliments, Parc Technologique Universitaire, 2 Rue J. Wetzell, F-97490 Sainte Clotilde, Réunion. Tel.: +33 262 48 33 43; fax: +33 262 48 33 48.

E-mail address: fabienne.remize@univ-reunion.fr (F. Remize).

### Abstract

Two categories of vegetables (carrots and green beans) that are widely used in the manufacture of canned food were surveyed for their spore contamination. Samples were recovered from 10 manufactures spread over all producing areas in France. Two samples over 316 raw vegetables collected were found positive for botulinum neurotoxin producing *Clostridia* spores as tested by PCR-based GeneDisc assay. Both positive samples tested positive for the type B neurotoxin gene (bont/B). In parallel, heat-resistant spores of thermophilic bacteria that are likely to be associated with canned food spoilage after prolonged incubation at 55 °C were surveyed after specific enrichment. Prevalence varied between 1.6% for *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica* in green bean samples and 8.6% for either *Geobacillus stearothermophilus* or *Thermoanaerobacterium* spp. in carrot samples. Vegetable preparation, e.g. washing and edge cutting, considerably reduced spore contamination levels. These data constitute the first wide examination of vegetables specifically cultivated for industrial purposes for their contamination by spores of thermophilic bacterial species.

**Keywords:** Canned food, Thermophilic spore-forming bacteria, Raw vegetable contamination, Heat preservation

## 1. Introduction

Proteolytic *Clostridium botulinum* is historically the reference pathogen for low acid canned food (Esty and Meyer, 1922). Epidemiological data show a relatively low incidence of 0.2 to 0.5 food-borne botulism cases per 1 million people, which is stable since 1991 in France and cases caused by industrially preserved canned food (Brown, 2000; Carlier et al., 2007; Mc Lauchlin et al., 2006) are not common. An outbreak of botulism occurred in south-east and northern France in early September 2011. The source of infection was considered to be a ground green olive paste. Botulinum type A toxin was identified in seven cases and in the incriminated olive paste (Pingeon et al., 2011). Incorrect sterilization techniques were observed at the artisanal producer's workshop. These episodes highlight the potential public health threat of *C. botulinum* linked to inadequate sterilization of food products. In October 2011 in Finland, two persons fell ill with symptoms compatible with botulism after having eaten conserved olives stuffed with almonds. One of these two died. *C. botulinum* type B and its neurotoxin were detected in the implicated olives by PCR and mouse bioassay, respectively. The olives were traced back to an Italian manufacturer and withdrawn from the market (Jalava et al., 2011). In two outbreaks, the Finnish and the French, defects potentially explaining the contamination were identified. In the Finnish outbreak, seals in other jars from the same batch were found to have defects, although none was found to be contaminated. In the French outbreak an improper sterilization process was identified. These outbreaks demonstrate that even modern industrialized production and distribution methods can occasionally allow contamination by botulinum toxin and prompt some important questions. Spores that are much more resistant than *C. botulinum* spores might be present in the food before retorting. Spoilage caused by mesophilic spore formers is very rare as regulatory control of retorting efficiency and canned food safety is based in many countries on stability tests performed between 30 and 37 °C (Ababouch, 1999). The most heat-resistant spores are formed by thermophilic bacteria (Ashton and Bernard, 1992; Byrer et al., 2000; Olson and Sorrells, 1992). Among the thermophilic group, the most heat-resistant spores belong to *Geobacillus stearothermophilus* and *Moorella thermoacetica* species. They exhibit a decimal reduction time, named D-value, of several minutes at 121 °C and more than 1 h at 124 °C



respectively (Byrer et al., 2000; Feeherry et al., 1987; Leguerinel et al., 2007; Sasaki et al., 2000; Wiegel et al., 1981). Persistence of spores in retorted foods may cause spoilage after an extended incubation at high temperature. The most described spoilage of low acid canned food, which is caused by *G. stearothermophilus* is flat sour, while *M. thermoacetica* is responsible for strong acidification and can swelling (Ashton and Bernard, 1992; Olson and Sorrells, 1992).

Despite a long history of description of these bacteria, the origin of spores in canned food is poorly investigated. In cooked food, a high number of ingredients are involved and may carry microbial contaminants (Membre and van Zuijlen, 2011). As an example, *G. stearothermophilus* is known to frequently contaminate dehydrated milk powders (Brent Seale et al., 2011; Ruckert et al., 2004; Ruckert et al., 2005). In single vegetables canned with brine, very few food components are involved. Therefore, spore contamination in these products probably comes from soil or may result from sporulation during food preparation (Carlin, 2011). The aim of this study was to evaluate how frequently spores from *C. botulinum* and thermophilic spoilage species may enter the vegetable canned food process lines, and if vegetable preparation such as washing and cutting was efficient to limit the entry of thermophilic spores in the process zone of transformation at elevated temperature.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Vegetable samples**

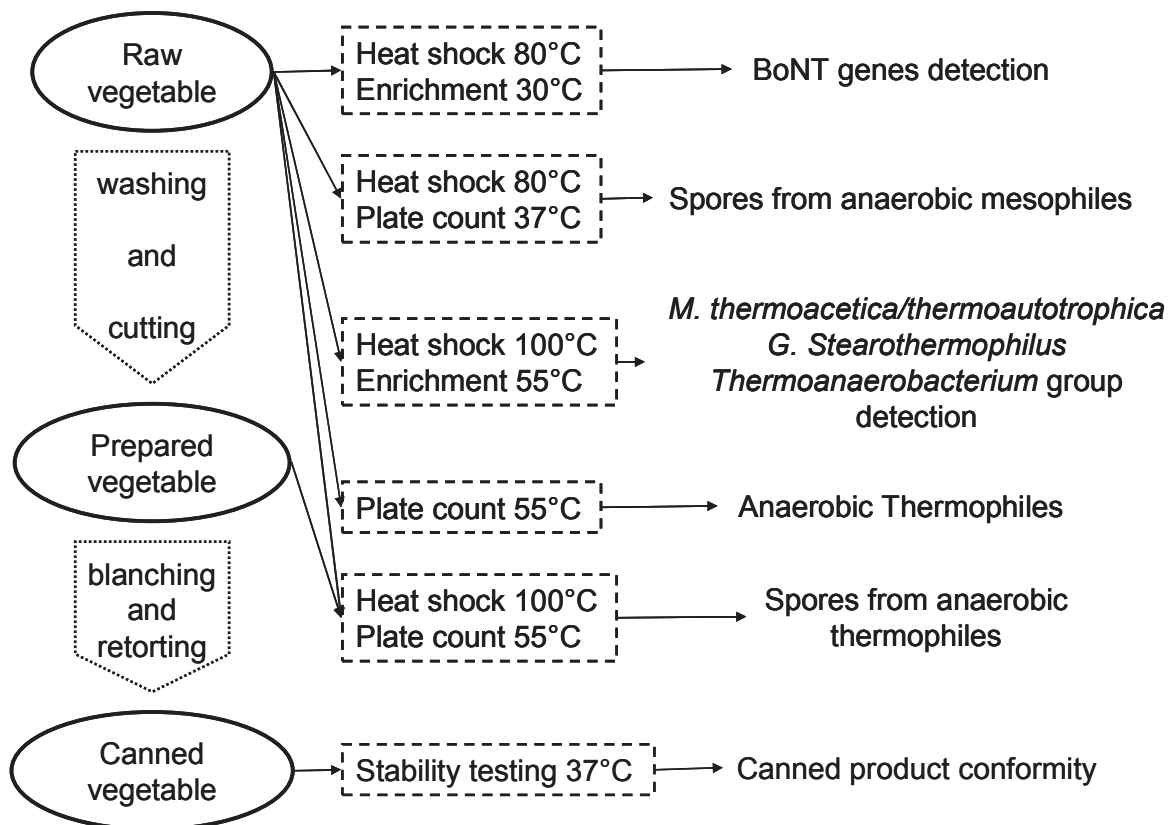
Sampling was performed from six manufactures for carrots (*Daucus carota*) and eight manufactures for green beans (*Phaseolus vulgaris*). The manufactures were located in different production areas of the French territory. The harvest period occurred between the 15th of June and the end of July 2010 for carrots, and between the 15th of July and the beginning of October 2010 for green beans. Twice a week, three 250 g-samples were randomly picked from each manufacture which collected the vegetable: one in the morning and one in the afternoon from raw vegetable, plus a sample after vegetable preparation, e.g. washing, edge cutting, possible peeling, just before the vegetable enters the plant zone where treatments at high temperature occur such as blanching and then retorting. A total of 128 raw carrots samples and 64 prepared carrots samples were collected over 6 weeks. For green beans, 188 raw samples and 93 prepared green beans were collected over 12 weeks. Samples were sent to the laboratory by rapid cold road transport and were processed on arrival.

Samples were aseptically cut in 3–4 cm slices and 10 g were weighted into sterile pouches under a laminar flow hood.

In parallel, manufacturers performed stability tests at 37 °C on canned vegetables according to their own sampling plants. All tests performed from canned food corresponding to sampling days of this study revealed 100% stable products.

## 2.2. Heat shock, enrichment procedure and DNA extraction

Raw samples were assayed for anaerobic mesophilic heatresistant spore counts, anaerobic thermophilic bacteria counts and anaerobic thermophilic heat-resistant spore counts (Fig. 1). In addition, presence of *C. botulinum* and anaerobic thermophilic heatresistant spore in 10-g samples was determined. Prepared vegetable samples were assayed for anaerobic thermophilic bacteria counts and anaerobic thermophilic heat-resistant spore counts.



**Figure 1** Schematic representation of sample preparation and testing

For anaerobic mesophilic spore counts, samples were homogenized with an identical weight of peptone water in a stomacher (AES Chemunex, Ivry sur Seine, France) for 1 min. 10 mL were collected into a glass tube and a thermal treatment of 10 min at 80 °C in a water bath was applied prior to mesophilic anaerobic spore count determination. Mesophilic anaerobic

spores were enumerated by pouring 1 mL on meat-liver glucose agar (Biokar diagnostics, Beauvais, France) complemented with 2 g/L yeast extract and incubated for 48 h at 37 °C under anaerobiosis. The detection limit was thus 2 cfu/g. Anaerobiosis was ensured by an anaerobiosis generator system (anaerogen 3.5 L, Oxoid, Dardilly, France) in a locked jar. Anaerobiosis was verified with anaerobic indicators (Biomérieux, Craaponne, France).

For *C. botulinum* detection, samples were enriched in anaerobic conditions as previously described (Braconnier, 2001; Braconnier et al., 2001). First, 10-g samples were 10-fold diluted in TGY (tryptone-glucose-yeast extract) medium containing cycloserine 200 mg/L. The 100-mL stomacher filtrate was transferred in a 120- mL bottle and subsequently submitted to a heat shock in a water bath corresponding to an effective incubation of the suspension of 10 min at 80 °C. The cooled down treated bottle was incubated for 72 h at 30 °C with a paraffin stopper to maintain anaerobiosis.

For thermophilic bacterial spores, another 10-g sample was 10-fold diluted in Rosenow (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) medium and homogenized. The resulting 100-mL stomacher filtrate was collected for subsequent use. Three milliliters were directly used for anaerobic thermophilic bacteria counts by pouring 1 mL directly or after decimal dilutions on meat-liver glucose agar complemented with 2 g/L yeast extract and incubated for 4 days at 55 °C under anaerobiosis. Consequently, the detection limit for thermophilic anaerobic bacteria was 10 cfu/gL. The remaining 97-mL sample was treated in a boiling water bath such as the sample was kept effectively for 10 min above 95 °C. It was directly used for anaerobic thermophilic spore count determination by pouring 1 mL on agar medium. The detection limit for anaerobic thermophilic spore counts was 2 cfu/g as five plates were inoculated with 1 mL from each sample. For anaerobic thermophile detection, an enrichment of 4 days at 55 °C with a paraffin stopper was performed from the remaining heat-treated suspension. After enrichment, both for *C. botulinum* in TGY medium and for anaerobic thermophiles in Rosenow broth, 1 mL was sampled from each enrichment condition, centrifuged (3000×g, 5 min) and cell pellets after supernatant elimination were stored at -20 °C.

DNA was extracted from cell pellets with the InstaGene® lysis system following the manufacturer's instruction (Bio-Rad, Marnesla-Coquette).

### 2.3. Detection of the *bont* genes using the BoNT GeneDisc® array

Detection of bont-genes was performed from 30 °C-TGY enrichments of raw vegetables heat-treated at 80 °C for 10 min (Fig. 1). The BoNT GeneDisc® array has been designed for simultaneous examination of six different samples, each being tested for four bont-specific gene targets, together with negative and inhibition controls. It has the following settings: microwell 1) PCR inhibition control, microwell 2) bont/A, microwell 3) bont/B, microwell 4) bont/E, microwell 5) bont/F, and microwell 6) negative PCR control. The oligonucleotide primers and gene probes used in the GeneDisc® have been described previously (Fach et al., 2009). All oligonucleotides were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). GeneDisc® spotting and manufacturing was performed by Pall- GeneSystems (Bruz, France). PCR analyses with the GeneDisc® array were performed as described by Fach et al. (2011). Thirty six microliters of DNA extract was tested with the GeneDisc® array.

### 2.4. Highly heat-resistant thermophilic spore-forming bacteria detection

Detection of highly heat-resistant spore (HRS) forming bacteria was performed from 55 °C-Rosenow broth enrichments of raw vegetables heat-treated for 10 min at 100 °C (Fig. 1). A group-specific detection PCR was used according to Prevost et al. (2010) with some modifications. *G. stearothermophilus* was detected by a specific 302-bp amplicon corresponding to rRNA ITS 16S–23S region. The group corresponding to the two species *M. thermoacetica* and *M. thermoautotrophica*, which share a 16S rRNA identity of more than 99%, was detected as a 486-bp amplicon. The reverse primer sequence was modified such as a 10-fold decrease of the detection limit from DNA was obtained. To achieve this, two 5' nucleotides were removed, leading to a better PCR yield without changes in specificity of detection (data not shown). The new primer sequence was 5'-AGGCTATTCGCCTTTAAGAC- 3'. The last detected group corresponded to the genus *Thermoanaerobacterium* plus *Caldanaerobius* and *Thermoanaerobacter*, which all belong to the *Thermoanaerobacterales* order. A 468-bp amplicon was expected.

PCR was performed with 0.2 mM dNTP, either 1.5 mM or 3 mM magnesium chloride respectively for *G. stearothermophilus* plus *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* or *Thermoanaerobacterium* group, Taq polymerase (Diamond Taq polymerase, Eurogentec, Seraing, Belgium) 2 U and DNA 5 µL in a 25-µL final volume (Prevost et al., 2010). The thermal profile involved 40 cycles with annealing at 65 °C and elongation time of 1 min. Amplicons were detected after 1% Seakem agarose (Lonza, Paris, France) gel electrophoresis

in TAE buffer and ethidium bromide staining (Prevost et al., 2010). Ladders were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium).

## 2.5. Statistics

Statistical analysis was carried out with XLSTAT Version 2010.3.02 (Addinsoft, Paris). Correlation tests were performed by linear regression and Pearson coefficient calculation. Mean comparisons were performed by a t-test in case of two-means comparison, and by a two-factors analysis in other cases. To point out significant differences between means, a Bonferroni test was done. Confidence interval for incidence was estimated as 1.96 standard deviation interval. Proportion comparisons were performed according to Fleiss (1981).

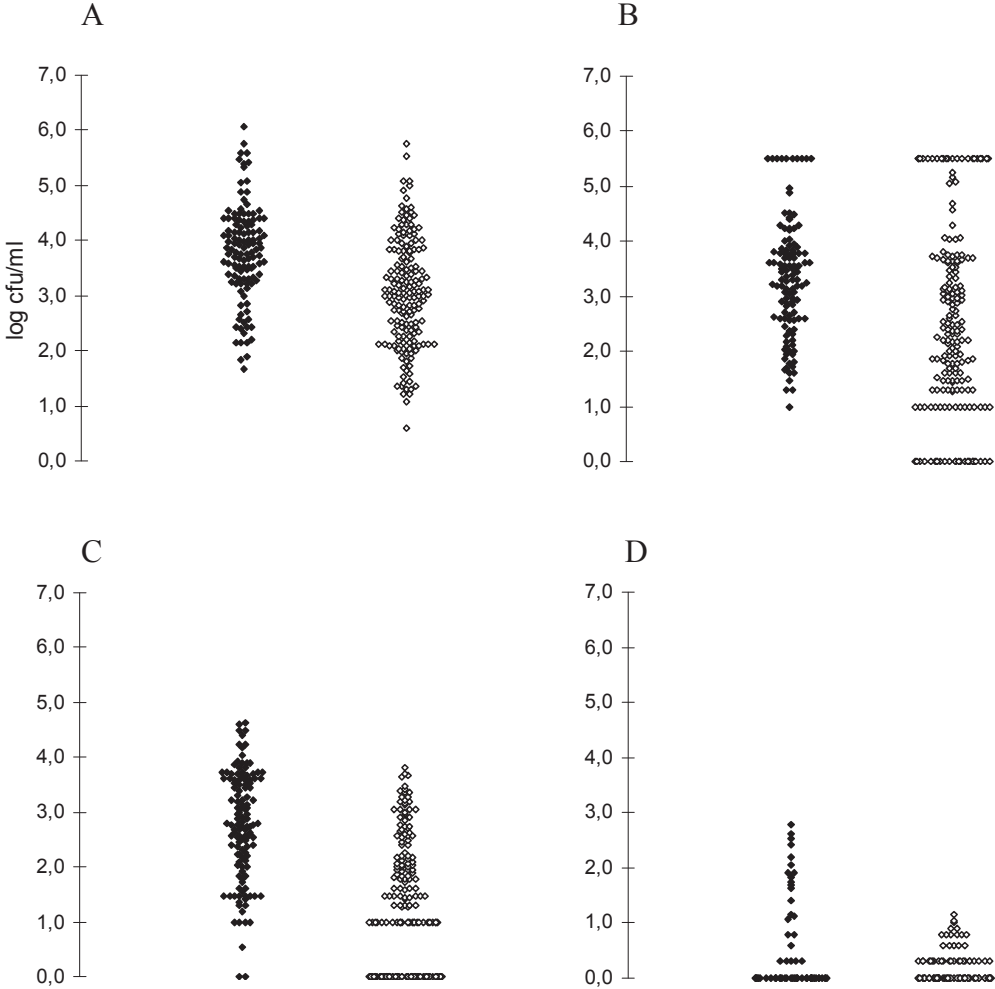
## 3. Results

### 3.1. Enumeration of spores

Results from vegetative cells and/or spore counts from raw vegetables are presented in Table 1 and Fig. 2. Contamination levels ranged between 1 log cfu/g for thermophilic anaerobic spores to 6.1 log cfu/g for mesophilic anaerobic spores. Examination of the different microbial group populations determined on raw vegetables showed that the highest contamination levels were observed for mesophilic spores and the lowest for thermophilic spores. Relationships between the determined populations, expressed as log cfu/g, were further investigated. Correlation analysis showed that enumeration values for mesophilic spores were not correlated to thermophilic spore counts ( $p$ -value=0.021 but Pearson coefficient $\leq$ 0.06). Nevertheless, a positive correlation was detected by linear regression ( $p$ -value $\leq$ 0.0001) between thermophilic spore counts and thermophiles (vegetative cells plus spores) counts. The slope confidence interval at 95% was [0.36; 0.70]. However, the square of Pearson coefficient was 0.29, indicating a weak correlation.

For each microbial group considered, contamination levels, expressed as log cfu/g, were compared between the two vegetables. A t-test showed, with  $p$ -values $\leq$ 0.0001 and risk  $\alpha$  of 0.05, that each of anaerobic mesophilic spore, anaerobic thermophile and anaerobic thermophilic spore counts significantly differed between both vegetables: whatever the population considered, raw carrots exhibited systematically higher contamination levels than raw green beans (Table 1; Fig. 2). In addition, prepared carrots were also significantly more contaminated by thermophilic anaerobic spores than prepared green beans.

**Figure 2** Distribution of microbial group populations from carrots and green beans.



(A) anaerobic mesophilic spores from raw vegetables; (B) anaerobic thermophiles from raw vegetables; (C) anaerobic thermophilic spores from raw vegetables; (D) anaerobic thermophilic spores from prepared vegetables. Black symbols correspond to carrot analyses; open symbols to green beans. Enumeration values below detection limit were drawn as 0 and counts above detection limit were marked at maximal value.

**Table 1** Vegetative or heat-resistant spore enumeration from vegetable samples

Vegetable	number of observations	minimum	mean $\pm$ standard dev	maximum
mesophilic anaerobic spore counts (log cfu/mL)				
raw carrot	121	1.7	3.8 $\pm$ 0.9 A	6.1
raw green bean	172	0.6	3.0 $\pm$ 1.0 B	5.8
anaerobic thermophiles counts (log cfu/mL)				
raw carrot	117	1.0	3.3 $\pm$ 1.1 A	>5.5*
raw green bean	187	<1*	2.5 $\pm$ 1.7 B	>5.5*
thermophilic anaerobic spore counts (log cfu/mL)				
raw carrot	126	<1*	2.7 $\pm$ 1.0 A	4.6
raw green bean	188	<1*	1.3 $\pm$ 1.2 B	3.8
prepared carrot	63	<0.3*	0.5 $\pm$ 0.8 C	2.8
prepared green bean	92	<0.3*	0.2 $\pm$ 0.3 D	1.1

\* for mean and standard deviation calculation, counts below detection limit were considered as 0 and counts above detection limit were used at maximal value. Different letters correspond for each microbial group to significant differences (p-value < 0.001).

The effect of the nature of the vegetable and state of sampling (raw or prepared) was determined by two-factors variance analysis applied to anaerobic thermophilic spore counts. A conservative Bonferroni test showed a significant difference (p-value<0.0001) between means for both factors. Thus, vegetable preparation was efficient to reduce thermophilic spore counts in each vegetable considered. An average decrease of 1.5 log cfu/g was observed. However, differences between vegetables were noticed (Fig. 2). Indeed, the confidence interval at 95% for mean differences was [1.9; 2.5] for carrots and [0.8; 1.3] for green beans, which means a more pronounced decontamination effect for carrots than for green beans. This difference is related to the initial contamination level, i.e. low initial contamination levels cannot be decontaminated as effectively as a high initial level. Another way to estimate decontamination effect is to compare the proportion of samples from each vegetable and each state of sampling that exhibit anaerobic thermophilic populations above the detection limits. 98.4% of raw carrots and 62.2% of raw green beans were contaminated by thermophilic anaerobic spores, with a detection limit of 10 cfu/g (Fig. 2). The contaminated proportions were decreased respectively to 38.1% and 42.4% for the two vegetables, after vegetable preparation and with a detection limit of 2 cfu/g (Fig. 2).

### 3.2. Prevalence of *C. botulinum* spores

From the analysis of 316 raw vegetable sample enrichments, spores of *C. botulinum* were detected in two samples, one from raw carrot and one from raw green beans (Table 2). Both corresponded to *C. botulinum* type B. As a result, 0.8% and 0.5% of incidence for BoNT producing spores were calculated respectively for carrots and green beans. A global incidence with 95% confident interval of [0; 1.5] was calculated.

### 3.3. Prevalence of thermophiles

316 raw vegetable sample anaerobic enrichments performed after heat selection at 100 °C were used to detect three groups of highly HRS: *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica*, *G. stearothermophilus* and *Thermoanaerobacterium* group (Table 2). Incidence ranged between 1.6% in green beans for *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* and 8.6% in carrots for both *G. stearothermophilus* and *Thermoanaerobacterium* group. Surprisingly, the incidence of thermophilic spore species was not significantly higher for carrots than for green beans, excepted for *G. stearothermophilus* (p-value=0.008). Whatever the sample category, the detection frequency was the lowest for *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* and the highest for *Thermoanaerobacterium* group.

**Table 2** Incidence and 95% confidence interval (in brackets) of *C. botulinum* and highly HRS in raw vegetable samples

	raw carrots	raw green beans
number of tested samples	128	188
<i>C. botulinum</i>	0.8% [0; 2.3]	0.5% [0; 1.6]
<i>M. thermoacetica</i> / <i>thermoautotrophica</i>	4.7% [1.0; 8.3]	1.6% [0; 3.4]
<i>G. stearothermophilus</i>	8.6% [3.7; 13.4]	2.1% [0.1; 4.2]
<i>Thermoanaerobacterium</i> group	8.6% [3.7; 13.4]	4.3% [1.4 ; 7.1]
highly HRS assayed	19.5% [12.7; 26.4]	8.0% [4.1; 11.9]

## 4. Discussion

*C. botulinum* is considered as the reference pathogenic bacterium for canned food. In industrial canneries, *C. botulinum* risk is well controlled by good manufacturing practices. The inactivation by retorting of the most heat-resistant mesophilic bacteria is checked by a product stability test after prolonged incubation at 37 °C, frequently called “ambient commercial sterility test”. In this study, thanks to a rapid new molecular tool (Fach et al., 2011), we



examined for the first time the incidence of this bacteria in raw vegetables cultured specifically for the French canning industry. The determined incidence values fall into usual ranges for *C. botulinum* in foods containing vegetables or raw vegetables, as positive samples usually represented 0 to 0.36% of all samples tested in previous studies (Braconnier et al., 2001; Gibbs et al., 1994; Insalata et al., 1969; Lilly et al., 1995). The highest contamination levels are described for fishes and *C. botulinum* type E is the main type described in this kind of food products. For raw vegetables, *C. botulinum* types B and A are the main types described, with type B as the most common in Europe (Carlin et al., 2004). Our data confirm previous observations, as type B was the only type found.

A second objective of the study was to examine the levels of anaerobic thermophilic bacteria in vegetables intended for industrial canning and to evaluate the incidence of some groups of highly heatresistant spore-forming bacteria, well-known as spoilage bacteria in canned food. To achieve “elevated-temperature commercial sterility”, including during storage in extreme temperature conditions, thermophile spores which exhibit particularly high heat-resistance have to be considered by manufacturers. Spores of highly heat-resistant bacteria can contaminate the product by entering the processing line with raw materials and ingredients and/or by sporulation during the high-temperature food-preparation steps (Carlin, 2011). We show here that process lines are continually flowed-in by highly heat-resistant spores but contamination levels are largely dependent on the kind of raw material. The higher contamination level of carrots compared to green beans was expected due to the presence of soil particles on the root vegetable. *Thermoanaerobacterium* group was the most frequently detected, which was expected as this group gathers many species and several genera. On the whole, almost 20% of raw carrots exhibited highly-HRS-species contamination and 8% of raw green beans did. This means that highly-HRS-species regularly enter canned-food processing lines. Soil is the habitat of many sporeforming bacteria, including *M. thermoacetica* in anoxic microzones (Drake and Daniel, 2004; Gossner et al., 1999). The ability of highly heat-resistant strains to persist in diverse environments is linked to the longevity of their spores.

The thermophilic spore load after cold-zone vegetable preparation was low, but still approx. 40% of the samples analyzed at this state exhibited contamination above the detection limit of 2 cfu/g. After cold-zone preparation, vegetables enter an elevated-temperature transformation zone which starts with blanching. Afterwards, vegetables are poured into cans with a hot-juice, mainly constituted of salt, sometimes sugar, and water, afterwards, cans are sealed before retorting. During vegetable processing at elevated temperature, the environmental

conditions become favorable for multiplication of thermophiles and sporulation. Effective multiplication and sporulation would depend on various factors, such as process duration, temperature profile and atmosphere. Taking into account the continuous flow of thermophilic spores entering the elevated-temperature zone, control of sporulation during this step is probably critical to achieve “high temperature commercial sterility”. Further studies should aim to elucidate this hypothesis. Control of bacteria in canned food depends on the initial amount of spores in the product and thermal process setting parameters (Leguerinel et al., 2007; Membre and van Zuijlen, 2011). However, retort process settings cannot be indefinitely increased unless products are overcooked. Highly heat-resistant bacteria control is consequently much more efficiently approached by considering prevalence and concentration before thermal treatment, and suitable preparation treatments, likely to reduce and control the spore contamination before blanching and retorting. Knowledge of heat-resistant spore-forming bacterial load and incidence are crucial to elaborate new strategies to minimize retort process setting parameters that ensure canned product quality.

### **Acknowledgments**

This work was supported by French canners and FranceAgriMer.

### **References**

- Ababouch, L., 1999. Spoilage problems associated with canning. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patten, P. (Eds.), *Encyclopedia of food microbiology*. Academic Press, San Diego, pp. 1016–1023.
- Ashton, D., Bernard, D., 1992. Thermophilic anaerobic sporeformers, In: Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 3rd Edition. American Public Health Association, Washington, D.C, pp. 309–316.
- Braconnier, A., 2001. Recherche de *Clostridium botulinum* dans les plats cuisinés et étude de sa croissance dans des substrats à base de légumes, Ph. D. Thesis, Université Aix-Marseille, France.
- Braconnier, A., Broussolle, V., Perelle, S., Fach, P., Nguyen-The, C., Carlin, F., 2001. Screening for *Clostridium botulinum* type A, B, and E in cooked chilled foods containing vegetables and raw material using polymerase chain reaction and molecular probes. *Journal of Food Protection* 64, 201–207.

- Brent Seale, R., Flint, S.H., James Mc Quillan, A., Bremer, P.J., 2011. Effect of NaOH (caustic wash) on the viability, surface characteristics and adhesion of spores of a *Geobacillus* sp. isolated from a milk powder production line. *Letters in Applied Microbiology* 52, 104–108.
- Brown, K.L., 2000. Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin* 56, 158–171.
- Byrer, D.E., Rainey, F.A., Wiegel, J., 2000. Novel strains of *Moorella thermoacetica* form unusually heat-resistant spores. *Archives of Microbiology* 174, 334–339.
- Carrier, J.-P., Espié, E., Popoff, M., 2007. Le botulisme humain en France, 2003–2006. In *VS - Bulletin épidémiologique hebdomadaire* 29–30, 261–263.
- Carlin, F., 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology* 28, 177–182.
- Carlin, F., Broussolle, V., Perelle, S., Litman, S., Fach, P., 2004. Prevalence of *Clostridium botulinum* in food raw materials used in REPFEDs manufactured in France. *International Journal of Food Microbiology* 91, 141–145.
- Drake, H.L., Daniel, S.L., 2004. Physiology of the thermophilic acetogen *Moorella thermoacetica*. *Research in Microbiology* 155, 869–883.
- Esty, J.R., Meyer, K.F., 1922. The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. XI. *Journal of Infectious Diseases* 31, 650–663.
- Fach, P., Micheau, P., Mazuet, C., Perelle, S., Popoff, M., 2009. Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum*. *Journal of Applied Microbiology* 107, 465–473.
- Fach, P., Fenicia, L., Knutsson, R., Wielinga, P.R., Anniballi, F., Delibato, E., Auricchio, B., Woudstra, C., Agren, J., Segerman, B., de Medici, D., van Rotterdam, B.J., 2011. An innovative molecular detection tool for tracking and tracing *Clostridium botulinum* types A, B, E, F and other botulinum neurotoxin producing *Clostridia* based on the GeneDisc cyclor. *International Journal of Food Microbiology* 145 (Suppl. 1), S145–S151.
- Feeherry, F.E., Munsey, D.T., Rowley, D.B., 1987. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 365–370.
- Fleiss, J.L. (Ed.), 1981. *Statistical Methods for Rates and Proportions*. John Wiley and Sons, New York.

- Gibbs, P.A., Davies, A.R., Fletcher, R.S., 1994. Incidence and growth of psychrotrophic *Clostridium botulinum* in foods. *Food Control* 5, 5–7.
- 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.
- Insalata, N.F., Witzeman, S.J., Fredericks, G.J., Sunga, F.C., 1969. Incidence study of spores of *Clostridium botulinum* in convenience foods. *Applied Microbiology* 17, 542–544.
- Jalava, K., Selby, K., Pihlajasaari, A., Kolho, E., Dahlsten, E., Forss, N., Bäcklund, T., Korkeala, H., Honkanen-Buzalski, T., Hulkko, T., Derman, Y., Järvinen, A., Kotilainen, H., Kultanen, L., Ruutu, P., Lyytikaäinen, O., Lindström, M., 2011. Two cases of food-borne botulism in Finland caused by conserved olives, October 2011. *Eurosurveillance* 16 (49) 08 December 2011.
- Leguerinel, I., Couvert, O., Mafart, P., 2007. Modelling the influence of the sporulation temperature upon the bacterial spore heat resistance, application to heating process calculation. *International Journal of Food Microbiology* 114, 100–104.
- Lilly, T., Salomon, H.M., Rhodehamel, E.J., 1995. Incidence of *Clostridium botulinum* in vegetables packaged under vacuum or modified atmosphere. *Journal of Food Protection* 59, 59–61.
- Mc Lauchlin, J., Grant, K.A., Little, C.L., 2006. Food-borne botulism in the United Kingdom. *Journal of Public Health (Oxford)* 28, 337–342.
- Membre, J.M., van Zuijlen, A., 2011. A probabilistic approach to determine thermal process setting parameters: application for commercial sterility of products. *International Journal of Food Microbiology* 144, 413–420.
- Olson, K.E., Sorrells, K.M., 1992. Thermophilic flat sour 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, pp. 299–308.
- Pingeon, J.M., Vanbockstael, C., Popoff, M.R., King, L.A., Deschamps, B., Pradel, G., Dupont, H., Spanjaard, A., Houdard, A., Mazuet, C., Belaizi, B., Bourgeois, S., Lemgueres, S., Debbat, K., Courant, P., Quirin, R., Malfait, P., 2011. Two outbreaks of botulism associated with consumption of green olive paste, France, September 2011. *Eurosurveillance* 16 (49) 08 December 2011.

- Prevost, S., Andre, S., Remize, F., 2010. PCR Detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage. *Current Microbiology* 61, 525–533.
- Ruckert, 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.
- Ruckert, 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.
- 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.
- 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.

## 5.2. Modélisation de la flore sporulante de lignes de production de haricots verts en conserves (article 4)

### Contexte

Les principaux germes d'altération des conserves ayant été définis précédemment (Cf. paragraphe 5.1.1.) comme la contamination initiale entrant sur les lignes (Cf. paragraphe 5.1.2.), il est apparu nécessaire de comprendre comment cette flore se comportait jusqu'au traitement thermique voire dans le produit fini. La zone dite chaude d'un processus de légumes en conserve correspond à la zone du procédé où les légumes sont chauffés par le blancheur, suite au parage, jusqu'à la fermeture des emballages avant le traitement assainissant (Figure 1, étapes en gras). Les légumes blanchis à plus de 95°C (étape d'inactivation des enzymes et de dégazage) et plus ou moins refroidis à la sortie de cette étape restent à des températures permettant la croissance ou la sporulation des germes thermophiles jusqu'à la fin des étapes d'emboitage puis sertissage. De ce fait, cette zone devient une zone critique pour la maîtrise de la contamination microbienne tout particulièrement thermophile et un effort particulier doit être fait pour contrôler celle-ci. Avant cette étude, seuls des audits microbiologiques de lignes avaient été menés. Cela revenait à prendre uniquement une photographie de la ligne à un instant  $t$  mais sans information sur l'évolution dans le temps de la flore observée. De même, aucune modélisation de l'évolution de la flore sporulante sur une ligne de production n'avait été effectuée auparavant dans le domaine de la conserve.

### Protocole

Il a donc été défini un couple matrice / germe d'altération bien précis afin d'effectuer ce travail de modélisation de l'évolution de la contamination au cours du procédé allant des légumes entrant dans le blancheur jusqu'aux légumes contenus dans une conserve après le traitement thermique. Le résultat final de cette modélisation a été le pourcentage de non stabilité observé lors des tests de contrôle effectués par les industriels. Ce test de stabilité normé (NF V 08-408) permet de valider que l'échantillon est stable par incubation des échantillons à une température favorable à la croissance des micro-organismes. Si ces germes sont présents, et qu'ils sont capables de se développer dans les conditions de la conserve, alors ils vont se développer en modifiant les caractéristiques physico-chimiques de l'aliment et être détectés.

Dans ce but, la méthodologie de l'Appréciation Quantitative de l'Exposition (AQE) a semblé la meilleure approche, car l'AQE permet d'évaluer une exposition dans le produit fini ainsi

que la pertinence des choix de gestion de ce risque et cela, en fonction de différentes variables. Pour représenter l'ensemble de ces interactions, un réseau bayésien a été utilisé pour ses nombreux avantages correspondant à notre problématique. Tout d'abord, sa représentation graphique permet une visualisation rapide, intuitive et facile de la conception du modèle créé. De plus, il a l'avantage de pouvoir utiliser des données de diverses origines (historiques, équations, distributions) mais aussi de dire d'experts. Dans l'optique d'une approche probabiliste, la simulation de Monte-Carlo a été choisie. Elle a l'avantage d'aider à la décision grâce à l'expression finale d'une plage de résultats possibles auxquels sont associées des probabilités selon les actions choisies. Au final, pour exploiter le modèle construit, une analyse de sensibilité a été effectuée pour mettre en évidence l'influence de la variation de paramètres du modèle, donc identifier les tâches unitaires les plus impactantes sur le résultat final. De plus, pour aider au choix et/ou apprécier l'impact d'une action toujours sur le résultat final (i.e. un moyen de maîtrise) des tests de scénario ont été exécutés.

### Résultats

*G. stearothermophilus*, par sa forte occurrence dans les conserves non stables (Cf. paragraphe 5.1.1.) ainsi que les haricots verts par leur fort tonnage de production annuel ont été sélectionnés pour l'étude. A partir des résultats obtenus précédemment, des points de prélèvements ont été définis pour un total de 390 échantillons prélevés lors de 2 campagnes effectuées lors de 2 années consécutives, dans 2 usines différentes. Les spores thermophiles aérobies ont été dénombrées puis l'espèce *G. stearothermophilus* a été recherchée par la méthode SporeTraQ™. L'ensemble des données, après élicitation d'experts, a été utilisé par Clémence Rigaux (étudiante en thèse à AgroParisTech) pour construire le modèle d'évolution de la concentration en spores de *G. stearothermophilus* menant à un taux de stabilité. La valeur théorique obtenue a été comparée et trouvée très proche de la moyenne réelle obtenue à partir des historiques des 14 plus importantes usines françaises de conserves de légumes.

### Valorisation

Le modèle produit a permis de modéliser la contamination en spores de *G. stearothermophilus* jusqu'à obtenir un taux de non stabilité réaliste dans les conditions de production rencontrées. Malheureusement, le modèle n'a pu être validé qu'avec des taux de non stabilité faibles car bien que les 2 campagnes avaient été choisies dans des usines devant présenter des profils microbiologiques de lignes différents, le hasard a voulu que les 2 usines aient un taux de stabilité faible et identique lors des campagnes de prélèvements. Une validation par confrontation avec une maîtrise de l'hygiène de ligne moins performante n'a

donc pas été possible. Cependant, ces analyses menées sur l'ensemble d'une campagne ont confirmé la validité des hypothèses sur les points critiques des lignes des conserveries de légumes formulées suite à des audits effectués ponctuellement.

Cette étude a été publiée dans International Journal of Food Microbiology en 2014.



**Quantitative assessment of the risk of microbial spoilage in foods. Prediction of non-stability at 55°C caused by *Geobacillus stearothermophilus* in canned green beans.**

Clémence Rigaux<sup>a\*</sup>, Stéphane André<sup>b</sup>, Isabelle Albert<sup>a</sup>, Frédéric Carlin<sup>c,d</sup>

International Journal of Food Microbiology (2014), 171 119–128

<sup>a</sup>INRA, UR 1204, Met@risk, Food Risk Analysis Methodologies, F-75005 Paris, France

<sup>b</sup>CTCPA, Site Agroparc, ZA de l'aéroport, F-84911 Avignon, France

<sup>c</sup>INRA, UMR 408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

<sup>d</sup>Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, UMR 408, Sécurité et Qualité des Produits d'Origine Végétale, F-84000 Avignon, France

\*Corresponding author

**Abstract**

Microbial spoilage of canned foods by thermophilic and highly heat-resistant spore-forming bacteria, such as *Geobacillus stearothermophilus*, is a persistent problem in the food industry. An incubation test at 55°C for 7 days, then validation of biological stability, is used as an indicator of compliance with good manufacturing practices. We propose a microbial risk assessment model predicting the percentage of non-stability due to *G. stearothermophilus* in canned green beans manufactured by a French company. The model accounts for initial microbial contaminations of fresh unprocessed green beans with *G. stearothermophilus*, cross-contaminations in the processing chain, inactivation processes and probability of survival and growth. The sterilization process is modeled by an equivalent heating time depending on sterilization value  $F_0$  and on *G. stearothermophilus* resistance parameter  $z_T$ . Following the recommendations of international organizations, second order Monte-Carlo simulations are used, separately propagating uncertainty and variability on parameters.

As a result of the model, the mean predicted non-stability rate is of 0.5%, with a 95% uncertainty interval of [0.1%; 1.2%], which is highly similar to data communicated by the French industry. A sensitivity analysis based on Sobol indices and some scenario tests

underline the importance of cross-contamination at the blanching step, in addition to inactivation due to the sterilization process.

**Key-words:** *Geobacillus stearothermophilus*; prevalence; cross contaminations; Process risk model; Second order Monte Carlo simulation; sensitivity analysis.

## 1. Introduction

Canned foods have an excellent safety record due to the inactivation of pathogenic bacteria. The highest risk for public health, due to *Clostridium botulinum*, is controlled in low acid foods ( $\text{pH} > 4.5$ ) by the application of the ‘botulinum cook’, which is defined as equivalent to 3 min heating at 121°C. However the spoilage of canned foods because of the persistence of non-pathogenic thermophilic and highly heat-resistant spore-forming bacteria is still an industrial and economical risk (Logan and De Vos, 2009; Burgess et al., 2010; Prevost et al., 2010). The stability after incubation at 55°C for 7 days (French standard NF V08-408 (AFNOR, 1997)) of canned foods is used as a hygiene indicator and as a norm for exportation to hot-climate regions as required by some national regulations, such as that of France (Anonymous, 1997). Among thermophilic bacteria, *Geobacillus stearothermophilus* is recognized as a major source of spoilage in canned foods and is frequently detected in cans presenting defects after a 7-day incubation at 55°C (André et al., 2013).

The canning process combines several operations allowing contamination, inactivation and/or growth of micro-organisms. The final stability is the result of the individual contributions of the processing operations. In this work, the fate of *G. stearothermophilus* is modeled along a canned green bean processing chain to predict the rate of non-stability due to *G. stearothermophilus* after the standard incubation test at 55°C. A quantitative microbial risk assessment was used, with a probabilistic approach accounting for sources of variability and uncertainty. Variability represents the natural heterogeneity of a factor, coming for instance from heterogeneity between bacterial strains, and is irreducible by nature. Uncertainty comes from a reducible lack of knowledge on the true value of a parameter and for instance from a lack of information, sampling or measurement errors (Pouillot and Delignette-Muller, 2010; Vose, 2000). Risk variability distributions and evaluation of uncertainty associated with this spoilage risk were obtained using a two-dimensional Monte Carlo simulation separately propagating uncertainty and variability through the model (Vose, 2000; Mokhtari and Frey, 2005; Pouillot et al., 2007; Pouillot and Delignette-Muller, 2010). This distinction is useful

for risk managers and has been recommended by international organizations since a few years (Codex Alimentarius Commission, 1999; European Commission, 2003).

The aim of this study was to predict the risk of spoilage in canned foods and to evaluate the reliability of the prediction. Next, the impact on the final predictions of several risk management options or of the potential consequences of the uncertainty of some assumptions was tested using what-if scenarios. A sensitivity analysis using Sobol indices allowed the detection of the most influential risk parameters.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Overview of the model

A modular process risk model (Nauta, 2001) has been developed. This was made up of several steps following the contamination of green beans with *G. stearothermophilus* from the fresh unprocessed product to the end of the industrial canning process. *G. stearothermophilus* growth leading to the spoilage of canned green beans is considered during a 7-day incubation test at 55°C. The different steps of the food chain and the basic microbial process impacting the fate of *G. stearothermophilus* at each step were described in Table 1. Basically, the risk model accounts for (i) the inactivation of *G. stearothermophilus* during heating processes (blanching and sterilization), depending on processing time and temperature and on pH of canned food, (ii) cross-contamination at blanching and brining and (iii) the probability of survival and growth to cause spoilage after incubation. Expert opinion, literature data, information on the food process and specifically collected data, such as prevalence of *G. stearothermophilus* in green bean samples, have been used to build the model.

**Table 1** Description of the steps of the food pathway (including the incubation test) and link with the modeled basic microbial processes impacting the fate of *G. stearothermophilus*.

Step X of the food pathway and of incubation test (abbreviation)	Microbiological process affecting <i>G.stearothermophilus</i>
Green bean harvesting (INIT)	Initial contamination
Blanching (BLAN)	Inactivation of spores, and cross contamination by blanching water
Canning and brining (BRIN)	Cross-contamination by recovery brine
Sterilization (STERI)	Inactivation of spores
Cooling (COOL)	none
Incubation test (INCUB)	Germination then growth

Processing of green beans for canning is almost continuous, with no clear identification of batches. Consequently (and also for model simplification) the modeled unit is

one can containing 445 g of green beans filled with 405 g of covering brine, leading to a final weight of 850 g. Concentrations (or continuous numbers of CFU) of *G. stearothermophilus* were used at all steps of the model, except at the germination step which was modeled using discrete numbers (step occurring just after sterilization, with contaminations at low level). The outputs of the model are (i) the concentrations of *G. stearothermophilus* after sterilization and after incubation tests and (ii) the non-stability rate, i.e. the percentage of green bean cans presenting a defect at the end of the incubation test.

## 2.2 Determination of *G. stearothermophilus* concentrations at different processing steps

Concentrations of Aerobic Thermophilic Spores (ATS) were determined in samples of green beans collected on the chains of two processing plants during the 2-month production periods of years 2011 and 2012. Samples of 10 g were collected from raw green beans before blanching (number of samples n =95), and from blanched green beans immediately before can filling (n=93). Samples of 100 ml were collected from blanching water (n=45) and from covering brine (n =99). All samples were stored frozen at -18°C for 1 to 4 weeks, thawed at room temperature, homogenised, then treated at 100°C for 10 min to eliminate vegetative cells (French Standard NFV08-602) (AFNOR, 2011). Serial decimal dilutions were made in tryptone salt buffer and 1 ml was mixed with 25 ml melted BCP agar and incubated at 55°C for 2 days. When no colonies were detected, ATS counts were considered as left-censored data (i.e., under the threshold of detection: 10 CFU/g for solid samples or 1 CFU/ml for liquid samples). When colonies were detected, up to three colonies were randomly picked for identification of *G. stearothermophilus* using the molecular tool SporesTraQ™ (Prevost et al., 2010), in order to estimate the proportion (or ratio) of *G. stearothermophilus* among ATS.

## 2.3. Estimation of the green bean pH at different processing steps

The green bean pH at the blanching step was based on specific measurements on the process chain before sterilization. The pH of the sterilized product, in which growth will occur, was assumed identical to the pH of the covering brine after sterilization, which was measured by the canning processor according to the French standard NFV08-408 (AFNOR, 1997).

To estimate the pH during sterilization, cans (1/4 US size) were filled with 83 g of frozen blanched green beans and with 110 ml of covering brine made up of tap water and

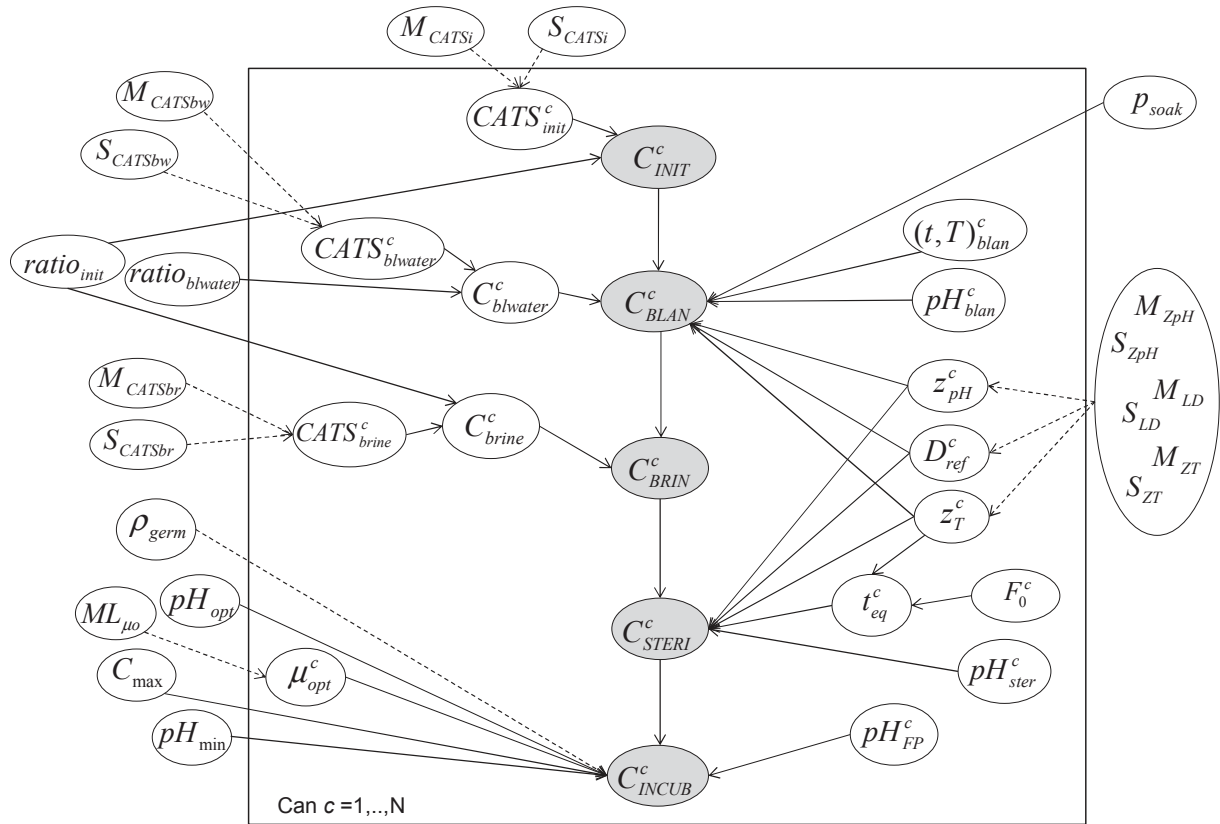
sodium chloride at 1% (wt/vol). Cans were placed in an autoclave and heated at 120 °C. Cans were sampled at regular time intervals between 0 min and 15 min after the come-up-time. The pH of the brine and of blended green beans was measured using a pHmeter calibrated at pH 4.0 and 7.0 buffer solutions (Sartorius, Aubagne, France). This procedure was applied on five samples of green beans for each time of treatment. A rapid equilibrium was shown between brine and green beans, no difference was observed immediately after the cut. Consequently the pH at equilibrium was considered as the pH to which *G. stearothermophilus* is subjected during sterilization.

#### *2.4. Two-dimensional Monte Carlo simulation*

Within the two-dimensional Monte Carlo simulation framework, uncertainty and variability were separately propagated through the model. According to expert opinions and data and modeling choices, parameters of the model were classified into four categories: fixed, variable, uncertain and both variable and uncertain, as previously detailed (Pouillot and Delignette-Muller., 2010). The simulations were made by first sampling in the uncertainty dimension (of sample size  $N_u$ ), then by sampling in the variability dimension (of sample size  $N_v$ ) conditionally to the sampled uncertain parameters (Vose, 2000; Pouillot et al., 2007; Pouillot and Delignette-Muller, 2010). This procedure leads to a global sample of size  $N_u \times N_v$ . The simulations were performed with  $N_u = 10000$  and  $N_v = 100000$ , using the R software (R Development Core Team, 2010).

## 2.5. Model and parameters

The overall model is represented by a directed acyclic graph (DAG) (Figure 1), which gives the conditional dependencies between the model parameters.



**Figure 1** The global risk model represented by a directed acyclic graph (DAG). Model parameters are represented by nodes. The nodes are described in Table 2 and/or in Section 2.3. The principal nodes  $C_X^c$ , are colored in grey; they denote the *G. stearothermophilus* concentrations at steps X of the food chain (see Table 1). Solid edges indicate deterministic links and dashed edges indicate stochastic links between nodes. Index c denotes the can numbers and specifies the can-dependent-variables. The correlation between the hyperparameters  $M_{ZT}$ ,  $M_{ZpH}$ ,  $M_{Dref}$ ,  $S_{ZT}$ ,  $S_{ZpH}$  and  $S_{Dref}$  is indicated by grouping in a single node.

### 2.5.1. Initial contamination and cross-contamination sources

Log-normal (base e) variability distributions were adjusted on the measured ATS concentrations based upon maximum likelihood estimation, and parameter uncertainty was evaluated by non-parametric bootstrap using the R package fitdistrplus (Pouillot and Delignette-Muller, 2010). *G. stearothermophilus* ratio among ATS at blanching was

significantly different from the ratio in blanching water and in covering brine, and this was considered in the model parameters. The corresponding adjusted distributions are presented in Table 2. The concentrations in green beans before filling were used to validate the model. As no significant correlation between ATS concentrations and *G. stearothermophilus* ratios was detected, the *G. stearothermophilus* concentration is given by:

$$C_x = CATS_x \cdot ratio_x \quad (1)$$

where  $C_x$  (resp.  $CATS_x$ ) (CFU/g) is the *G. stearothermophilus* (resp. ATS) concentration and  $ratio_x$  is the proportion of *G. stearothermophilus* among ATS in the contamination source  $x$ .  $x$  represents either the fresh green beans ( $x=init$ ) or the blanching water ( $x=blwater$ ) or brine ( $x=brine$ ).

**Table 2** Model parameters: description, variability and uncertainty distribution, mean and 95% CI of the global marginal distribution.

Parameter	Description (unit)	Variability distribution	Uncertainty distribution	Mean and 95% probability range <sup>a</sup>	Source <sup>c</sup>	
Contamination param.	$CATS_{init}$	ATS concentrations in fresh green beans ( $\log_{10}$ CFU/g)	$N(M_{CATSi}; S_{CATSi})$	$M_{CATSi} \sim N(0.44; 0.24)$ $S_{CATSi} \sim LnN(-0.11; 0.39)$	0.4 [-1.7; 2.6]	Spec. data
	$CATS_{blwater}$	ATS concentrations in blanching water ( $\log_{10}$ CFU/g)	$N(M_{CATSbw}; S_{CATSbw})$	$M_{CATSbw} \sim N(2.26; 0.18)$ $S_{CATSbw} \sim LnN(0.17; 0.10)$	2.3 [-0.1; 4.6]	Spec. data
	$CATS_{brine}$	ATS concentrations in brine ( $\log_{10}$ CFU/g)	$N(M_{CATSbr}; S_{CATSbr})$	$M_{CATSbr} \sim N(0.37; 0.14)$ $S_{CATSbr} \sim LnN(0.13; 0.07)$	0.4 [-1.9; 2.6]	Spec. data
	$ratio_{init}$	Proportion of Gbs among ATS in fresh green beans or in brine	-	$B(78; 167)$	0.32 [0.26; 0.38]	Spec. data
	$ratio_{blwater}$	Proportion of Gbs among ATS in blanching water	-	$B(72; 39)$	0.65 [0.56; 0.73]	Spec. data
	$\rho_{soak}$	Water soak rate at blanching	-	$BP(1\%, 2.7\%, 6\%)$	0.03 [0.01; 0.05]	Spec. data
Microbial param. of <i>G.stearothermophilus</i>	$D_{ref}$	Time (min) to the first decimal reduction at T=121,1°C and pH=7	$10^{N(M_{LD}, S_{LD})}T(0.1; 30)$	$M_{LD} \sim N(0.432; 0.024)^b$ $S_{LD} \sim LnN(-1.277; 0.073)^b$	3.3 [0.8; 9.6]	Rigaux et al. 2013
	$z_T$	Increase in temperature resulting in a ten-fold reduction in $D_{ref}$ (°C)	$N(M_{zT}, S_{zT})T(3; 15)$	$M_{zT} \sim N(9.13; 0.34)^b$ $S_{zT} \sim LnN(0.60; 0.19)^b$	9.1 [5.5; 12.9]	Rigaux et al. 2013
	$z_{pH}$	Decrease in pH resulting in a ten-fold reduction in $D_{ref}$ (pH unit)	$N(M_{z_{pH}}, S_{z_{pH}})T(1; 13)$	$M_{z_{pH}} \sim LnN(1.45, 0.09)^b$ $S_{z_{pH}} \sim \Gamma(1.99, 3.29)^b$	4.3 [2.9; 6.2]	Rigaux et al. 2013
	$\rho_{germ}$	Spore germination probability	-	$B(4.6; 1.4)$	0.8 [0.4; 1.0]	Expert op.
	$C_{max}$	Maximum bacterial concentration in the product ( $\log_{10}$ CFU/g)	-	$N(9.00; 0.25)$	9.0 [8.5; 9.5]	Expert op.
	$\mu_{opt}$	Optimal growth rate ( $h^{-1}$ )	$BP(2.01; ML_{\mu_o}; 2.72)$	$ML_{\mu_o} \sim BP(2.20; 2.31; 2.43)$	2.3 [2.1; 2.6]	Based on Llaudes et al. 2001
	$pH_{min}$	Minimal growth cardinal pH	-	$N(5; 0.1)$	5.0 [4.8; 5.2]	Expert op.
	$pH_{opt}$	Optimal growth cardinal pH	-	$N(7; 0.1)$	7.0 [6.8; 7.2]	Expert op.
Environmental param.	$pH_{blan}$	Green bean pH during blanching	$N(6.4; 0.2)T(4.8; 7)$	-	6.4 [6.0; 6.8]	Spec. data
	$pH_{ster}$	Green bean pH during sterilisation	$N(5.8; 0.2)T(4.8; 7)$	-	5.8 [5.4; 6.2]	Spec. data
	$pH_{FP}$	Finished product pH	$N(5.55; 0.1)T(4.8; 7)$	-	5.5 [5.3; 5.7]	Spec. data
	$t_{blan}$	Blanching duration (min)	$BP(3.5; 6; 10)$	-	6.3 [4.2; 8.7]	Company
	$T_{blan}$	Blanching temperature (°C)	$BP(85; 91; 98)$	-	91.1 [86.7; 95.8]	Company
	$F_0$	Value of sterilisation (min)	$LnN(3.40, 0.11)$	-	30.2 [24.3; 37.2]	Company + model

$N(a; b)$  (resp.  $N(a; b)T(c, d)$ ,  $LnN(a; b)$ ) stands for the normal distribution (resp. the normal distribution truncated on  $[c; d]$ , the lognormal distribution based on a normal distribution) of mean  $a$  and standard deviation  $b$ .  $\Gamma(a; b)$  stands for the gamma distribution with shape parameter  $a$  and rate parameter  $b$ .  $BP(a; b; c)$  stands for a BetaPert distribution of minimum value  $a$ , most likely value  $b$  and maximum value  $c$ .  $B(a; b)$  stands for a Beta distribution of parameters  $a$  and  $b$ .

<sup>a</sup>Values are based on the confounded analysis of variability and uncertainty and were determined by Monte Carlo simulation (see Section 2.2).

<sup>b</sup>Some correlations between the hyperparameters (mean and SD) of  $D_{ref}$ ,  $z_T$  and  $z_{pH}$  were observed in the work of Rigaux et al. 2013, and are defined in Table 3. They may be taken into account using the Iman, Conover method {Iman, 1982 #87} which is implemented in the R package mc2d (Pouillot and Delignette-Muller, 2010).

<sup>c</sup>As sources, “Spec. data” means data specifically collected for this work, and “Expert op.” means expert opinion.



### 2.5.2 Inactivation models

Spore inactivation was assimilated to first order kinetics and survival curves were classically considered as log-linear. The primary inactivation model is therefore described by:

$$\log_{10}(C(t)) = \log_{10}(C(0)) - \frac{t}{D(T,pH)} \quad (2)$$

where  $C(0)$  (CFU/g) is the initial population at time 0 (min),  $t$  (min) is the processing time,  $C(t)$ (CFU/g) is the population at time  $t$ , and  $D(T, pH)$  (min) is the decimal reduction time at temperature  $T$  (°C) and pH at time of treatment.

The secondary model is an extension of the Bigelow model (Couvert, 2005). In addition to the effect of a temperature change on  $D$ , this model also describes the effect on  $D$  of a pH change. It is expressed as

$$D(T, pH) = D_{ref} \cdot 10^{(T_{ref}-T)/z_T} \cdot 10^{(pH-pH_{ref})/z_{pH}} \quad (3)$$

where  $T$  (°C) is the temperature and  $pH$  is the pH of the product during processing,  $T_{ref}$  (°C) is the reference temperature, here fixed at the reference sterilization temperature of 121.1°C,  $pH_{ref}$  (pH unit) is the pH of reference, fixed at 7.0,  $z_T$  (°C) is the increase in temperature resulting in a ten-fold reduction in  $D$ ,  $z_{pH}$  (pH unit) is the decrease in pH resulting in a ten-fold reduction in  $D$ , and  $D_{ref} = D_{121.1^\circ C, pH7}$  (min) is the decimal reduction time at 121.1°C and pH 7.

The heat resistance parameters  $D_{ref}$ ,  $z_T$  and  $z_{pH}$  were estimated from a meta-analysis performed on 430  $D$  values mainly issued from literature, using a hierarchical Bayesian model (Rigaux et al., 2013) as both uncertain and variable parameters (Table 2). Correlations between the hyperparameters (mean and standard deviation (SD) of  $D_{ref}$ ,  $z_T$  and  $z_{pH}$ ) (Table 3) were taken into account in the simulation using the Iman and Conover method (Iman and Conover, 1982).

Blanching duration and time-temperature profiles during the sterilization of canned green beans were communicated by the company and considered as variable parameters as done by Pouillot et al. (2007) (Table 2). The temperature was considered as homogeneous in the canned green beans under the assumption of convective heat diffusion.

The product pH during blanching and sterilization was considered variable. The pH distributions were based on specific measurements (Section 2.3) and assumed to be normal with mean 6.4 and standard deviation (SD) 0.2 (respectively mean 5.8 and SD 0.2), truncated on [4.8; 7] (see Table 2).

**Table 3** Spearman rank correlation between the hyperparameters of the microbial heat resistance parameters  $D_{ref}$ ,  $z_T$  and  $z_{pH}$  of *G. stearothermophilus*, defined in the work of Rigaux et al., 2013 {Rigaux, #99}. See Table 2 for the definitions of the hyperparameters.

Correlations	$M_{z_{pH}}$	$S_{z_{pH}}$	$M_{z_T}$	$S_{z_T}$	$M_{LD}$	$S_{LD}$
$M_{z_{pH}}$	1	0.70	0.01	0.01	-0.11	-0.06
$S_{z_{pH}}$	0.70	1	0.00	0.01	-0.07	-0.03
$M_{z_T}$	0.01	0.00	1	0.62	0.36	-0.39
$S_{z_T}$	0.01	0.01	0.62	1	0.33	-0.49
$M_{LD}$	-0.11	-0.07	0.36	0.33	1	-0.21
$S_{LD}$	-0.06	-0.03	-0.39	-0.49	-0.21	1

### 2.5.3. Calculation of a sterilization equivalent time

A sterilization equivalent time as a function of the sterilization value  $F_0$  (the reference descriptor of the applied heat treatment determined with  $z_T = 10^\circ\text{C}$ ) and of the resistance parameter  $z_T$  of the specific target bacterium (here *G. stearothermophilus*) was built. Six sterilization time-temperature profiles communicated by the company were first converted into equivalent heat treatments of duration  $t=t_{eq}(z_T)$  at the target temperature  $T_{ref}=121.1^\circ\text{C}$  using Eq. (4) (Fernandez and Peck, 1997) as follows:

$$t_{eq}(z_T) = \sum_{i=1}^n (t_i - t_{i-1}) 10^{\frac{1}{z_T} \left( \frac{T_i + T_{i-1}}{2} - T_{ref} \right)} \quad (4)$$

where  $t_i$  (min) and  $T_i$  ( $^\circ\text{C}$ ) are the observed time and temperature at the  $i^{\text{th}}$  measurement point of a time-temperature profile of  $n$  points  $(t_i, T_i)_{i=1, \dots, n}$ .

The resulting equivalent time  $t_{eq}(z_T)$  depends on *G. stearothermophilus*  $z_T$ , which varies from can to can at each iteration according to its probability distributions (Figure 2a, Table 2). A conversion model accounting for the dependence between  $z_T$  and  $t_{eq}$  and separating the effect of the bacteria resistance and of the heat treatment was built as follows. An almost linear dependence (Figure 2.b,  $R^2=0.88$ ) was observed between  $\ln(t_{eq})$  and  $1/z_T$  (which can be explained by the very low values, and consequently the non-significance, of the terms obtained in Eq. (4) at temperatures  $< 100^\circ\text{C}$ ). Then, following the envelope method {Vose, 2000 #19}, a least square regression of  $\ln(t_{eq})$  on  $1/z_T$  was performed and modeled by:

$$\ln(t_{eq}) = a + b \left( \frac{1}{z_T} \right) + \epsilon \quad (5)$$

$\epsilon \sim N(0, c)$  stands for a normal distribution of mean 0 and SD  $c$  and is the model error, which here mainly represents the variation in the applied time-temperature profiles. The

homogeneity of the error variance was assumed to simplify the model and to separate the effect of the heat treatment intensity ( $F_0$  and that of  $z_T$  (describing the effect of temperature changes on microbial resistance)).

Eq. (5) was then reformulated into Eq. (6) (Figure 2.b):

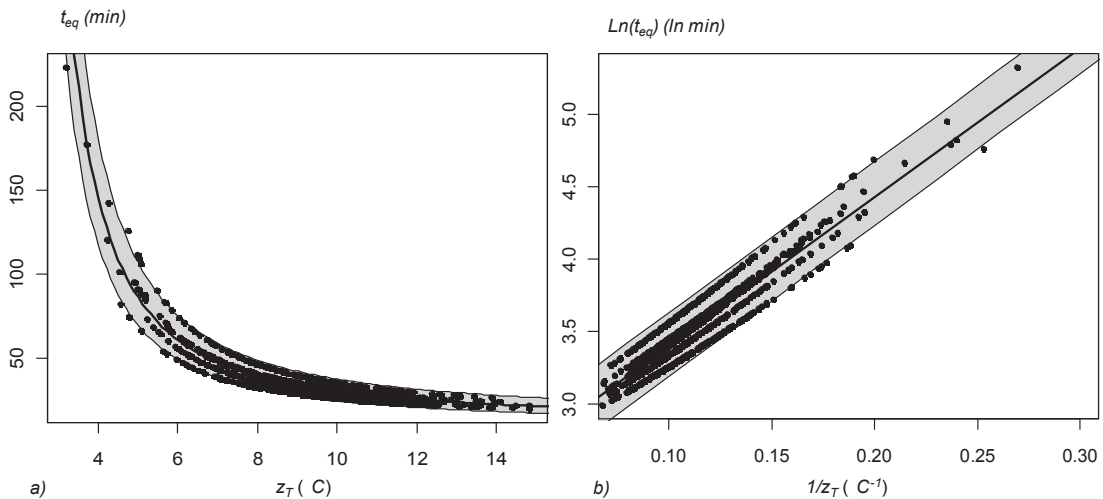
$$t_{eq} = \exp\left(b\left(\frac{1}{z_T} - \frac{1}{z_{TREF}}\right)\right) \cdot \exp(X) \quad (6)$$

$$\text{where } X = a + \frac{b}{z_{TREF}} + \epsilon \sim N\left(a + \frac{b}{z_{TREF}}, c\right).$$

By definition,  $F_0$  corresponds to the sterilization equivalent time at 121.1°C determined with reference value  $z_T = z_{TREF} = 10^\circ\text{C}$ . From Eq.(6)  $t_{eq} = \exp(X)$  when  $z_T = z_{TREF} = 10^\circ\text{C}$ . Thus  $F_0 = \exp(X)$  in Eq.(6) and Eq. (6) becomes Eq.(7):

$$t_{eq}(z_T, F_0) = \exp\left(b\left(\frac{1}{z_T} - \frac{1}{z_{TREF}}\right)\right) \cdot F_0 \quad (7)$$

The resulting  $F_0$  variability distribution is a lognormal distribution based on a normal distribution of mean 3.40 and standard deviation 0.11 (corresponding to estimations  $\hat{a}=2.36$  ln(min),  $\hat{b}=10.41^\circ\text{C}$  and  $\hat{c}=0.11$  ln(min)), leading to  $F_0$  values of mean 30.2min and 95% variability interval [24.1, 37.2]min, which is fully consistent with the  $F_0$  determined by the company from the time-temperature profiles.



**Figure 2** Sterilization equivalent time at 121.1°C  $t_{eq}$  as a function of the heat resistance parameter  $z_T$ (a),  $\text{Ln}(t_{eq})$  as a function of  $1/z_T$ (b), and envelopes of the adjusted models. Points correspond to a sample of 1000  $z_T$  (or  $1/z_T$ ) values and their corresponding equivalent times  $t_{eq}$  (or  $\text{Ln}(t_{eq})$ ) determined from Eq.(4). The bold middle lines represent the adjusted models (Eq.

7 and 5), and the bounding lines represent the 95% CI of the envelope (colored in grey).  $t_{eq}$  (or  $Ln(t_{eq})$ ) values corresponding to points in the envelope with a fixed  $z_T$  (or  $1/z_T$ ) value represent the 95% variability interval of the heat treatment.

#### 2.5.4 Cross-contamination models

Cross-contamination was simply assumed to bring a quantity of new spores in the can, following Eq. (8):

$$N_X = N_{X-1} + N_{Xcc} \quad (8)$$

where  $N_X$  (resp.  $N_{X-1}$ ) (CFU) is the quantity of *G. stearothermophilus* at the food chain step  $X$  (resp. at the step before step  $X$ ) and  $N_{Xcc}$  is the quantity of *G. stearothermophilus* brought by cross-contamination at step  $X$ .

The first source of cross-contamination is the blanching water. The quantity of spore contamination from the blanching water was considered as proportional to the amount of water impregnating green beans during this process step. The impregnating rate  $\rho_{soak}$  was estimated at around 2.7% using data obtained from an experimental measurement in laboratory consisting in weighing some green bean samples before and after a cooking process (data not shown)(see Table 2 for the adjusted distribution). The quantity of spores added (CFU) by cross-contamination at blanching is then defined by

$$N_{BLANcc} = w_{GB} \cdot \rho_{soak} \cdot C_{blwater} \quad (9)$$

where  $w_{GB} = 445$  g is the green bean weight at blanching, and  $C_{blwater}$  (CFU/g) is the *G. stearothermophilus* concentration in blanching water.

The second source of contamination comes from the recovery liquid at filling. The number of spores added (CFU) by cross-contamination from the recovery liquid is simply defined by

$$N_{BRINEcc} = w_{brine} \cdot C_{brine} \quad (10)$$

where  $w_{brine} = 405$  g is the brine weight in a can and  $C_{brine}$  (CFU/g) is the *G. stearothermophilus* concentration in brine defined in Section 2.3.1.

$N_X, N_{X-1}, N_{Xcc}, N_{BLANcc}$  and  $N_{BRINEcc}$  are described with continuous distributions.

#### 2.5.5 Incubation model

The incubation module is made of 3 steps: germination of spores, growth of vegetative cells and non-stability. Germination of spores may occur after sterilization. Each spore was assumed to have a probability  $p_{germ}$  of germinating. The model is defined by Eq. (11):

$$N_{Germination} = Bin(N_{STERI}, p_{germ}) \quad (11)$$

where  $Bin(a, b)$  stands for a binomial distribution of parameters  $a$  and  $b$ , and  $N_X$  (CFU) is the (rounded down to the next integer) number of spores at step  $X$ .

The primary growth model is the logistic model with delay {Rosso, 1995 #28}, defined by:

$$C(t) = \begin{cases} C(0) & \text{if } t < \lambda \\ C_{max}/[1 + \left(\frac{C_{max}}{C_0} - 1\right) \exp(-\mu_{max}(t - \lambda))] & \text{if } t \geq \lambda \end{cases} \quad (12)$$

where  $t$  (h) is the duration of the growth step,  $C(0)$  and  $C(t)$  (CFU/g) are respectively the modeled concentrations at time  $t=0$  and at time  $t$ ,  $C_{max}$  (CFU/g) is the maximum bacterial concentration in the product,  $\mu_{max}$  ( $h^{-1}$ ) the maximum growth rate and  $\lambda$  (h) the lag time.  $\lambda=0$  was assumed in this work as growth occurs in rather optimal conditions and as a fail-safe assumption.

The secondary growth model is based on the ‘‘Gamma’’ model developed by Zwietering et al. (1992){Zwietering, 1992 #101}, and describes  $\mu_{max}$  as a function of environmental conditions such as temperature, pH and water activity:

$$\mu_{max} = \mu_{opt} \cdot \gamma(T) \cdot \gamma(pH) \cdot \gamma(aw) \quad (13)$$

where  $\mu_{opt}$  ( $h^{-1}$ ) is the optimal growth rate in the product,  $\gamma(T)$ ,  $\gamma(pH)$  and  $\gamma(aw)$  describe the effect of the temperature  $T$ , the pH  $pH$  and the water activity  $aw$  on the growth rate. As water activity in green beans and the incubation temperature ( $T = 55^\circ C$ ) are almost optimal for the growth of *G. stearothermophilus*, it was assumed  $\gamma(T) = 1$  and  $\gamma(aw) = 1$ . The pH effect is described by (Rosso et al., 1995):

$$\gamma(pH) = \frac{(pH - pH_{min})(pH + pH_{min} - 2 pH_{opt})}{(pH - pH_{min})(pH + pH_{min} - 2 pH_{opt}) - (pH - pH_{opt})^2} \quad (14)$$

where  $pH_{min}$  and  $pH_{opt}$  (pH unit) are the minimal and optimal cardinal pH of *G. stearothermophilus*, and where  $pH_{max}$  in the original model was considered as equal to  $2 \cdot pH_{opt} - pH_{min}$ . (Augustin and Carlier, 2000).

Changes in pH were detected in food or medium containing populations higher than  $10^7$  *G. stearothermophilus*  $ml^{-1}$  (Llaudes et al., 2001; Yoo et al., 2006), and within 24h

incubation at 55°C (Llaudes et al., 2001). Non-stability was therefore assumed to occur if *G. stearothermophilus* concentration exceeds 7 log<sub>10</sub>CFU/g before 72 h incubation at 55°C. This assumption is rather conservative, as time to spoilage accounted in the model (at least 72 h) is substantially longer than the one reported in these previous works (usually 24 h).

The probability distributions on all the parameters used in the germination and growth models are described in Table 2. Specific laboratory experiments to determine the growth rate of spores of *G. stearothermophilus* strains (CTCPA 2804 173, 2804 138, 2804 168) were produced as previously described (André et al., 2012) and separately spiked at 10 spores/g and 102 spores/g in 50g of green beans in 50ml of brine. Despite suboptimal pH,  $\mu_{max}$  was of the same order of magnitude as that observed in other media and foods (Heinrich et al., 2008; Ng and Schaffner, 1997; Ng et al., 2002; Thompson and Thames, 1967; Yoo et al., 2006). We therefore assumed that canned green beans were a highly suitable medium for *G. stearothermophilus* growth and set the most likely value of  $\mu_{opt}$  at 2.3 h<sup>-1</sup>, based on the cell doubling time  $T_d$  reported by Llaudes et al. (2001) in tryptic soy broth ( $\mu_{opt} = \ln(2)/T_d$ ). As food conditions were highly suitable for growth and in absence of specific data, a high germination was also hypothesized and the probability of germination  $p_{germ}$  was set at around 90%. The pH of the sterilized product in which growth will occur was estimated at 5.5 pH unit on average, based on specific measurements (Section 2.3). *G. stearothermophilus*  $C_{max}$  values are between 10<sup>7</sup> and 10<sup>11</sup> (Thompson et al., 1967; Ng et al., 1997; Yoo et al., 2006; Heinrich et al., 2008; André unpublished data 2011). Mean  $C_{max}$  was taken at 10<sup>9</sup>, which is the middle of the range (on a log<sub>10</sub> scale) of these previously reported values.  $pH_{opt}$  was set at 7.0, which agrees with the optimal growth pH of *G. stearothermophilus* at pH 6.2 – 7.5 (Logan et al., 2009).  $pH_{min}$  was set at 5.0: no growth at pH 5.0 in green beans and possible growth at pH 5.2 have been reported in diverse instances (André, CTCPA, unpublished data).

## 2.6. Sensitivity analysis

Sobol sensitivity indices were determined by the Saltelli variance-based method (Saltelli, 2002) and computed with the R package sensitivity (Pujol et al., 2012). This method has been selected for its model independence, its capacity of integrating non-linearity, thresholds and interactions, and of treating untransformed variables (no need of discretization) (Frey et al., 2003; Ellouze et al., 2010).

The sensitivity analysis was performed on the variability parameters from samples of size  $N_v=100000$  (drawn from their variability distributions conditionally to a set of uncertain values), and was independently repeated for  $N_u=10000$  realizations of uncertainty, leading to an uncertainty distribution on the sensitivity indices. This approach, initially developed in association with an ANOVA by Mokhtari and Frey (2005) and further applied by Pouillot et al. (2007) and Membré et al. (2008), was here used with a computation of Sobol indices. The model response was *G. stearothermophilus* concentration after sterilization, CSTERI (in  $\log_{10}\text{CFU/g}$ ). To focus on the most relevant factors and for computational ease, the *G. stearothermophilus* concentrations  $C\_X$  were used instead of factors  $[\text{CATS}]\_x$  and  $[\text{ratio}]\_x$  (see Eq. (1) in 2.5.1). The validity of the Monte-Carlo estimation of the sensitivity indices was guaranteed by the independence of all factors (Saltelli, 2002). Sobol indices are comprised between 0 and 1. The highest Sobol indices indicate factors having the highest influence on the variability of the model response.

### 2.7. What-if scenarios

What-if scenarios were explored to test the effect of some decisions on the management of the risk of spoilage (scenarios 1 to 12) or of model assumptions (scenarios 13 to 16) on the estimated % of non-stability (Table 4). In scenarios 1 to 3, different  $F_0$  values were explored in the range [10; 25] min to test the effect of a decrease in the heat treatment at sterilization (mean  $F_0$  in the reference model = 30.3min). In scenarios 4 and 5, some better hygiene measures were tested, assuming no cross-contamination at the blanching or brining step, in combination with different  $F_0$  values (scenarios 6 and 7). Poor hygiene scenarios corresponding to higher microbial loads at the blanching and/or brining steps were explored (scenarios 8 to 10). The effect of a pH drop, obtained for instance by organic acid addition at brining as applied on some canned vegetables, was tested (scenarios 11 and 12). Scenarios 13 to 15 tested the impact of different germination rates. Finally, the effect of assuming independence between the hyperparameters of  $D_{ref}$ ,  $z_T$  and  $z_{pH}$  (see Section 2.5.2 and Table 2 and 3) was tested in scenario 16. The simulations were performed with  $N_u =1500$  and  $N_v =100000$ .

**Table 4** What-if-scenarios and corresponding non-stability rates (estimation [95% CI]). Parameters are described in Table 2 or in Section 2.3.3.

	What-if-scenario	Non-stability rate (%)
0	Reference model	0.5 [0.1; 1.2]
1	$F_0 = 25$ min	0.9 [0.3; 2.0]
2	$F_0 = 20$ min	2.0 [0.8; 3.9]
3	$F_0 = 10$ min	13.5 [8.5; 20.0]
4	$N_{BLANcc} = 0$ CFU	0.2 [0.0; 0.7]
5	$N_{BRINEcc} = 0$ CFU	0.4 [0.1; 1.0]
6	$F_0 = 20$ min and $N_{BLANcc} = 0$ CFU	1.1 [0.4 ; 2.6]
7	$F_0 = 25$ min and $N_{BLANcc} = 0$ CFU	0.5 [0.1 ; 1.3]
8	$CATS_{blwater} \sim N(4.3; 1.2)$ log <sub>10</sub> CFU/g	1.6 [0.7 ; 3.0]
9	$CATS_{brine} \sim N(2.4; 1.1)$ log <sub>10</sub> CFU/g	1.1 [0.4 ; 2.1]
10	$CATS_{blwater} \sim N(4.3; 1.2)$ log <sub>10</sub> CFU/g and $CATS_{brine} \sim N(2.4; 1.1)$ log <sub>10</sub> CFU/g	1.9 [0.8 ; 3.5]
11	$pH_{steri} = 5.55$ and $pH_{FP} = 5.25$	0.2 [0.0 ; 0.7]
12	$pH_{steri} = 5.45$ and $pH_{FP} = 5.15$	0.1 [0.0 ; 0.5]
13	$p_{germ} = 0.90$	0.5 [0.1; 1.2]
14	$p_{germ} = 0.10$	0.2 [0.0; 0.7]
15	$p_{germ} = 0.01$	0.1 [0.0; 0.3]
16	Independence between the hyperparameters of $D_{ref}$ , $z_T$ and $z_{pH}$ (see Tables 2 and 3)	0.5 [0.1; 1.3]

The non-stability rates were evaluated on the variability dimension. The point estimate and the 95%CI were respectively provided through the 50<sup>th</sup>, 2.5<sup>th</sup> and 97.5<sup>th</sup> percentiles evaluated in the uncertainty dimension. See Pouillot et al., 2007 {Pouillot, 2007 #31}, for more details on the estimation of some statistics after performing a second-order Monte Carlo simulation.



### 3. Results

#### 3.1. Fitted distributions of *G. stearothermophilus* from microbiological analyses at several processing steps

The microbiological analyses performed at several processing steps (Section 2.2) consistently showed the presence of significant populations of spores of aerobic thermophilic bacteria. Their statistical distributions are shown and designated as “contamination parameters” in Table 2. Among those, a high percentage of *G. stearothermophilus* (often  $\geq 30$  % of the ATS) was detected in the surveyed samples. For instance, the concentration of *G. stearothermophilus* spores in raw unprocessed green beans was estimated at a mean of  $-0.1 \log_{10}\text{CFU/g}$  with a 95 % variation range  $[Q_{0.025}, Q_{0.975}] = [-1.9, 1.7] \log_{10}\text{CFU/g}$  (Table 5).

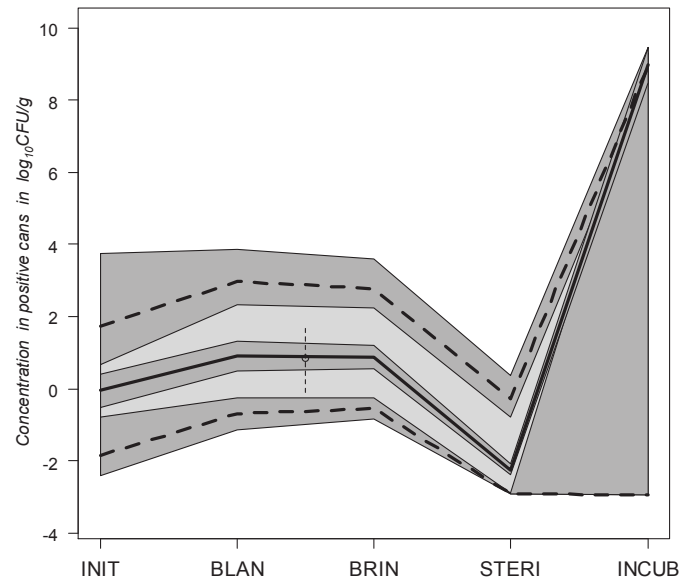
**Table 5** Statistics on the *G. stearothermophilus* evolution along the food pathway, distinguishing uncertainty and variability, in positive cans (i.e. containing at least one CFU). Estimation [95% CI] of prevalence, mean and median concentrations, and quantiles 0.025 and 0.975 of concentrations.

	Initial	Blanching	Brining	Sterilisation	Incubation
Prevalence (%)	99.8 [91.8; 100.0]	100.0 [100.0; 100.0]	100.0 [100.0; 100.0]	0.5 [0.2; 1.2]	0.5 [0.2; 1.2]
$Q_{0.025}$ concentration ( $\log_{10}\text{CFU/g}$ )	-1.8 [-2.4; -0.8]	-0.7 [-1.1; -0.3]	-0.6 [-0.8; -0.3]	-2.9 [-2.9; -2.9]	-2.9 [-2.9; 9.3]
Median concentration $Q_{0.50}$ ( $\log_{10}\text{CFU/g}$ )	0.0 [-0.5; 0.4]	0.9 [0.5; 1.3]	0.9 [0.6; 1.2]	-2.3 [-2.4; -2.1]	9.0 [8.5; 9.5]
Mean concentration ( $\log_{10}\text{CFU/g}$ )	0.9 [0.0; 3.9]	2.3 [1.6; 3.9]	2.1 [1.5; 3.6]	-1.0 [-1.6; 0.2]	9.0 [8.5; 9.4]
$Q_{0.975}$ concentration ( $\log_{10}\text{CFU/g}$ )	1.7 [0.7; 3.7]	3.0 [2.3; 3.9]	2.8 [2.2; 3.6]	-0.3 [-0.8; 0.4]	9.0 [8.5; 9.5]

All statistics were evaluated on the variability dimension. The point estimate and the 95%CI were respectively provided through the 50<sup>th</sup>, 2.5<sup>th</sup> and 97.5<sup>th</sup> percentiles evaluated in the uncertainty dimension.

#### 3.2 Predicted changes in concentrations during processing and non-stability prevalence

Two processing steps have a major impact on changes in the concentrations in *G. stearothermophilus* (Figure 3). These are the blanching step, which results in a global increase in the bacteria concentration due to cross contamination (the inactivation during this process operation is negligible: -1% on average), and the sterilization, which results in a high microbial inactivation. Clear-cut situations were observed during the 7-day incubation at 55°C: either growth leading to spoilage or no growth at all.

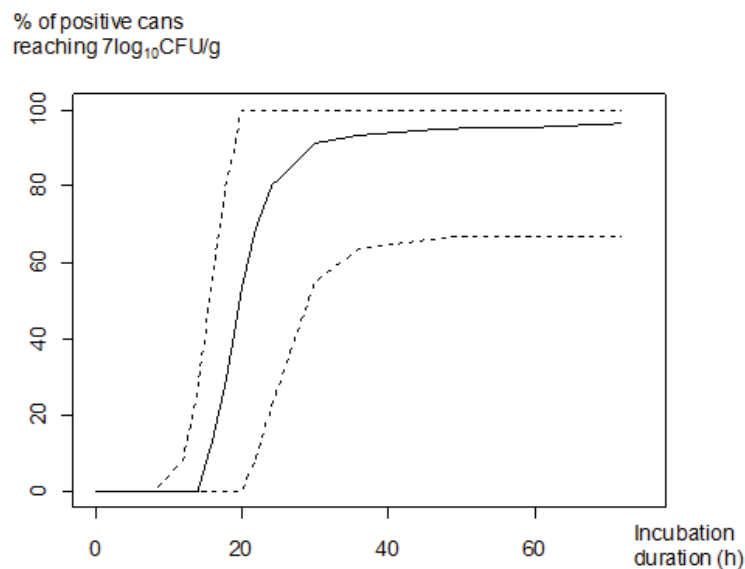


**Figure 3** *G. stearothermophilus* concentrations in positive cans modeled at the different steps *X* of the food chain (distinguishing uncertainty and variability). The solid thick line represents the median concentration, the dashed thick lines represent the limits of the 95% variability interval, and the dark grey zones represent the 95% uncertainty intervals on these statistics. The small circle represents the observed concentrations measured in green beans just before filling (see Section 2.3.1), and the vertical dashed segment represents the corresponding 95%CI.

Table 5 gives statistics on the evolution of the *G. stearothermophilus* concentration, distinguishing uncertainty and variability in the results. Prevalence, which measures the proportion of cans containing at least one CFU is equal to 99.8% in unprocessed green beans, increases to 100.0% after blanching and decreases to 0.5% after sterilization. The variability of the concentrations in 95% of the cans is high before sterilization (e.g., 95% variation range= $[-0.7; 3.0]$  log<sub>10</sub>CFU/g at blanching). After sterilization, 95.5 % of cans do not contain any spore. In positive cans (i.e. cans containing at least one spore), the *G. stearothermophilus* concentration is quite variable (95% variation range=  $[-2.9; -0.3]$  log<sub>10</sub>CFU/g, which corresponds to 1 to 426 CFU per can) (Table 5 and Figure 3). The uncertainty associated with these different estimations is relatively low, except for the concentrations in the positive cans after incubation (95% CI on the lower limit of the the 95% variability interval of  $[2.9, 9.3]$  log<sub>10</sub>CFU/g). The impact of variability is higher than the weight of uncertainty in the

dispersion of concentrations just after sterilization (Figure 3), justifying the interest of performing a sensitivity analysis with regards to variability sources.

The model predicts that about 92% of the cans containing at least one spore after sterilization will develop spoilage. This is favored by the high growth ability of germinated spores, since 99.9% of the cans containing at least one vegetative cell after spore germination will develop spoilage. Before 72h and mostly around 24h, *G. stearothermophilus* concentration in positive cans exceeds  $7 \log_{10}\text{CFU/g}$ , which corresponds to the minimal concentration required for spoilage (Figure 4). Finally, the predicted non-stability rate is of 0.5% with a 95% uncertainty interval of [0.2%; 1.2%] and is equal to the prevalence rate after sterilization (0.5%, 95%CI=[0.2%; 1.2%]).



**Figure 4** Percentage of positive cans reaching  $7 \log_{10}\text{CFU/g}$  (corresponding to spoilage) as a function of the incubation duration. Solid lines represent the percentage estimation and dashed lines indicate the 95%CI, representing uncertainty around the estimation. The percentages were evaluated on the variability dimension. The point estimate and the 95%CI were respectively provided through the 50<sup>th</sup>, 2.5<sup>th</sup> and 97.5<sup>th</sup> percentiles evaluated in the uncertainty dimension.

### 3.3. Validation of the model with independent data

These predictions have been compared with two sets of observed data for model validation. These data were independent of the ones used for model construction. The first data set consists in *G. stearothermophilus* concentrations in green beans immediately before can filling, defined as the product of the measured ATS concentration and the measured *G. stearothermophilus* ratio (see Section 2) (Figure 3). This concentration ( $0.9 \log_{10}\text{CFU/g}$ , 95% CI=[-0.1; 1.8]) is equal to the modeled median concentration before filling ( $0.9 \log_{10}\text{CFU/g}$ ) and is totally included in the predicted 95% variation range ( $[-0.7; 3.0] \log_{10}\text{CFU/g}$ ), which is quite satisfying.

The second set of data compared with predictions is the percentage of non-stability at 55°C due to *G. stearothermophilus* reported by green bean processors. The general percentage of non-stability {AFNOR, 1997 #103} recorded on a ten-year survey by 13 processors was equal to 1.5% with a 95% Clopper-Pearson proportion confidence interval (CPpCI) of [1.3%; 1.6%] for a total of approximately 63,000 tested green bean cans (André, CTCPA, unpublished data). The observed percentage of non-stability specifically due to *G. stearothermophilus* was obtained by multiplying the global percentage of non-stability by the percentage of non-stability specifically due to *G. stearothermophilus* in canned green beans. This latter percentage is approximately equal to 58% (with a 95% CPpCI of [33%; 80%]) {André, 2012 #158}. Consequently, the general percentage of non-stability due to *G. stearothermophilus* was estimated at 0.9%, with a 95%CI of [0.5%; 1.2%]. The *specific* observed percentage of non-stability at 55°C of the 643 tested green bean cans at the period and in the plants where the microbiological analyses were performed was slightly less (not mentioned for confidentiality reasons) than the general percentage of non-stability. Consequently the *specific* observed percentage of non-stability specifically due to *G. stearothermophilus* was slightly less than 0.9%. This latter observed rate has to be compared to the modelled non-stability rate which was 0.5% (95%CI = [0.1%; 1.2%]). The two rates are very close and the credible intervals largely overlap.

### 3. 4 Determination of the most influential factors by sensitivity analysis

The sensitivity analysis based on the calculation of Sobol indices (Table 6) detects the variable factors having a major influence on the variability of *G. stearothermophilus* concentration in green bean cans after sterilization. The variability range of each factor is the one defined in the model. The *G. stearothermophilus* heat resistance parameter  $D_{ref}$  is the

most influential factor: it explains 69% of the response variability ( $S_i = 0.69$  with 95%CI=[0.56; 0.79]) and also has a high influence when interacting with other factors as shown by a high  $St_i$  at 0.91. The second most influential parameter is the *G. stearothermophilus* heat resistance parameter  $z_T$ . Its influence is linked to interactions with other factors as  $St_i$  (which accounts for interactions between factors) is equal to 0.18 and  $S_i$  is equal to only 0.04. The computation of second-order indices (data not shown) logically showed that the major interaction was between  $D_{ref}$  and  $z_T$  ( $S_{ij}^2 \approx 0.10$ ). Four factors also have a significant (but much less pronounced) influence on the variability of the model response: the value of sterilization  $F_0$ , the product pH during sterilization  $pH_{steri}$ , the heat resistance parameter  $z_{pH}$  and the *G. stearothermophilus* contamination in blanching water  $C_{blwater}$  (respectively  $St_i = 0.05$ ,  $St_i = 0.05$ ,  $St_i = 0.03$  and  $St_i = 0.03$ ). The sources of uncertainty of the model parameters do not question the major influence of  $D_{ref}$  and  $z_T$  because the 95% CI on their  $St_i$  do not (or only marginally) overlap with other factors. However a noticeable exception is  $z_{pH}$ , with a large 95% CI on  $St_i$  suggesting a rather uncertain influence (from null to moderate) on the variability of the model.

**Table 6** Sensitivity analysis: estimation [95% CI] of the total effect indices  $St_i$ , the first-order indices  $S_i$ . The model output is the *G. stearothermophilus* concentration after sterilization,  $C_{STERI}$  (in  $\log_{10}$ CFU/g).

Factors	$St_i$	$S_i$
$D_{ref}$	0.91 [0.83; 0.99]	0.69 [0.56; 0.79]
$z_T$	0.18 [0.10; 0.29]	0.04 [0.01; 0.09]
$F_0$	0.05 [0.04; 0.07]	0.01 [-0.01; 0.03]
$pH_{steri}$	0.05 [0.03; 0.08]	0.01 [-0.01; 0.03]
$z_{pH}$	0.03 [0.00; 0.16]	0.01 [-0.01; 0.04]
$C_{blwater}$	0.02 [0.01; 0.04]	0.01 [-0.01; 0.02]
$C_{brine}$	0.01 [0.00; 0.02]	0.00 [-0.01; 0.01]
$C_{INIT}$	0.00 [0.00; 0.03]	0.00 [0.00; 0.01]
$t_{blan}$	0.00 [0.00; 0.00]	0.00 [0.00; 0.00]
$T_{blan}$	0.00 [0.00; 0.00]	0.00 [0.00; 0.00]
$pH_{blan}$	0.00 [0.00; 0.00]	0.00 [0.00; 0.00]

The indices were evaluated on the variability dimension. The point estimate and the 95%CI of the indices were respectively provided through the 50<sup>th</sup>, 2.5<sup>th</sup> and 97.5<sup>th</sup> percentiles evaluated in the uncertainty dimension.

In addition, the impact of different sources of uncertainty was analyzed in scenarios assuming no uncertainty on some parameters (or group of parameters). The highest sources of uncertainty are on the microbiological resistance parameters  $z_T$ ,  $z_{pH}$  and  $D_{ref}$ , and to a lesser extent the uncertainty on the different sources of (cross) contamination. The potential consequences of uncertainty were investigated with a sensibility analysis based on the

calculus of Sobol indices in the confounded uncertainty and variability dimensions (parameters distributions reflecting both variations in uncertainty and variability). Even when including uncertainty, the parameters whose variation has the highest influence on *G. stearothermophilus* concentrations after sterilization are the same as those designated by the sensibility analysis in the variability dimension ( $D_{ref}$ ,  $z_T$ ,  $z_{pH}$ ,  $F_0$  and  $pH_{steri}$ ), but with a slightly higher influence of  $z_{pH}$  (results not shown).

### *3.5 What-if scenarios to test the influence of microbiological phenomena and options of spoilage risk management*

Model predictions satisfactorily fitted with some observations (percentage of non-stability, concentrations at one processing step) (Section 3.2). Consequently the model can be used to test the consequences of some new scenarios not initially described by the model (Table 4).

The non-stability rate markedly decreases when the  $F_0$  increases, with for instance a non-stability rate of 13.5% for a  $F_0$  of 10min and of 0.9% for a  $F_0$  of 25min (Table 4, scenarios 1 to 3). Scenarios 4 and 5 show that assuming no cross-contamination during filling results in very little change in the response, whereas the impact of no cross-contamination at blanching results in a decrease in non-stability by a half (medians of 0.2% versus 0.4%). Scenarios 6 to 7 show that improvement of hygiene (i.e. absence of cross-contamination at blanching) could allow a reduction of the sterilization value  $F_0$  with no or only a slight increase in the non-stability rate. Conversely, higher microbial loads at the blanching and/or the brining steps (hypotheses of a 2-log increase in ATS contaminations) caused up to four-times higher rates of non-stability (scenarios 8 to 10). A slight decrease in pH by 0.25 or 0.35 on average resulted in a marked decrease in the non-stability rates (scenarios 11 and 12). Scenarios 13 to 15 show that only a high decrease in the germination rate causes a significant decrease in the non-stability rate. The impact of assuming independence between the hyperparameters of the heat resistant parameters  $D_{ref}$ ,  $z_T$  and  $z_{pH}$  is also very low, with only a slight increase in the upper limit of the 95%CI representing uncertainty. However these results must be taken with caution because of the sometimes relatively high impact of uncertainty. For instance the uncertainty intervals of most non-stability rates overlap the uncertainty intervals of the reference model.

#### 4. Discussion

The framework usually developed for the assessment of the microbial risk of foodborne poisoning was applied to the assessment of the risk of spoilage of canned food. The model estimated the changes in *G. stearothermophilus* concentration along a canned green-bean processing chain and gave a satisfactory prediction of the risk of non-stability reported by green bean canners. The predicted non-stability rate of 0.5%, with 95%CI = [0.2%; 1.2%] was close to the estimation of the industrial non-stability risk due to *G. stearothermophilus*, which was slightly less than 0.9%.

Consequently the model was considered suitable for testing the consequences of some risk management options or of some biological assumptions. Increasing the hygiene during processing (corresponding to an absence of *G. stearothermophilus* contamination at the blanching step) reduced the % of non-stability by a half or kept it at the same level with a simultaneous reduction in the  $F_0$  value. Approximately the same reduction was obtained by an increase in  $F_0$  of 5 min in the range  $F_0 = 10$  to  $F_0 = 25$  min. A pH decrease could also interestingly reduce the percentage of non-stability. On the contrary, a poor respect of hygiene allowing high microbial loads in blanching water or in covering brine may lead to increase in non-stability rates. Moreover, the model hypothesized a high germination rate, meaning that most spores of *G. stearothermophilus* contaminating a can of green beans after sterilization would be able to germinate and grow. Germination and outgrowth of spores of *Bacillus* species and of *G. stearothermophilus* is generally impaired by heat stress, as shown by difficult recovery in suboptimal growth conditions (Feeherry et al., 1987; Leguerinel et al., 2005). That is why the consequences of different germination assumptions were tested. Current scientific knowledge does not suggest a very low germination rate of surviving spores after heat treatment. Using a more sophisticated model accounting for an interaction between heat shock intensity and probability of germination is therefore not necessary. The influence of the growth parameters could also have been tested, as a few data are currently available. However these data consistently show a rapid growth of *G. stearothermophilus* in foods and media at a range of pH similar to the one considered in this work, followed by a rapid spoilage (pH decrease).

Additionally, the model could be improved by new data and/or scientific knowledge. A possible additional cross-contamination source is the release of green bean debris during transfer along the food production chain. These debris have a much higher ATS concentration (mean at  $1.7 \log_{10}\text{CFU/g}$ , with a 95% variation range = [-2.0, 5.4] according to experimental measurements) than do fresh unprocessed green beans (Table 2). They sporadically cross-



contaminate cans, but the rate of cross-contamination (% of contaminated cans and % of debris in those cans) is unknown. Consequently this was not integrated into the model. The primary inactivation model was assumed to be log-linear, although shoulders or tails are sometimes observed on survival curves; this is the most common assumption in the food industry (Rigaux et al. 2012). The absence of a selective medium for *G. stearothermophilus* led to dealing with ATS concentrations and confirmation tests.

Changes in *G. stearothermophilus* concentrations, sensitivity analyses and what-if-scenarios give consistent results. Important steps and risk factors were identified. The sterilization process is crucial (Figure 3, Tables 4 and 6), resulting in a high spore inactivation. The factors implicated in the sterilization model are unsurprisingly the most influential factors according to the sensitivity analysis ( $D_{ref}$ ,  $z_T$ ,  $pH_{steri}$ ,  $F_0$ ,  $z_{pH}$ ) (Table 6). The *G. stearothermophilus* decimal reduction time  $D_{ref}$  is actually so influential that it explains, alone or in interaction with the other factors, 91% of the variability of the *G. stearothermophilus* concentration after sterilization. The second and the fifth most influential factors are also heat resistance parameters of *G. stearothermophilus* ( $z_T$  and  $z_{pH}$ ). These parameters cannot be modified, which consequently restricts possible management actions to limit spoilage risk. The fourth most influential factor,  $pH_{steri}$ , would also be difficult to modify. Nevertheless, the  $F_0$ , as well as the cross-contamination from blanching water ( $C_{bwater}$ ), appears to be quite influential and constitutes possible points of management intervention (as illustrated in what-if-scenarios 1 to 7).

Sensitivity analysis is increasingly applied to risk assessment with one-dimension (Zwietering and Van Gerwen, 2000; Frey et al., 2003; Mokhtari et al., 2005; Ellouze et al., 2010) or two-dimension models (Pouillot et al., 2007; Membré et al., 2008; Mataragas et al., 2010; Busschaert et al., 2011). Sensitivity analysis or what-if-scenarios may be used to identify the highest sources of variability and of uncertainty in the final model. They can also be used early in model construction for prioritizing additional research, and improving or simplifying the model. For instance the sensitivity analysis showed in this work the importance of product pH during sterilization ( $pH_{steri}$ ). Further pH measurements were therefore performed. What-if-scenarios exploring the effect of modeling assumptions showed that a complex germination model was certainly unnecessary. Based on the results of the sensitivity analysis (Table 6), fixing some parameters of low influence, such as blanching time and temperature, could be a reasonable option.

Spoilage control and product safety in the canning industry are based on simple principles: a minimal heat-treatment for low-acid foods ( $F_0 = 3$  min, the “botulinum cook”)



and an additional heat-treatment to guarantee microbiological stability. Increasing the heat-treatment reduces spoilage occurrence and unsurprisingly the model predictions give a similar conclusion. However this is a costly operation in terms of energy and impact on product organoleptic quality and nutritional value. The model suggests to some extent that hygiene control, a top priority for many food industries, may also be efficient in vegetable canning for the control of process intensity. Testing the consequences of process modifications with models, such as the one developed in this work, are efficient methods for industry managers to prepare important decisions.

### **Acknowledgments**

This work is a partial fulfillment of author C. Rigaux's PhD Thesis, has been supported by *Agence Nationale de la Recherche* Paris, France under contract ANR-09-ALIA-014 (Ribenuit project), and is a contribution to the research activity of *Unité Mixte Technologique* Qualiveg. Thanks are due to Dr Olivier Couvert (LUBEM, Quimper, France) and to Jean-Baptiste Denis (INRA, Jouy-en-Josas, France) for kind communication of data and helpful scientific discussions. Thanks are also due to Rachel Galland (Bonduelle, France) and to other industrial partners for kindly providing technical information about process.

### **References**

- AFNOR. 1997. Norme NFV08-408 Microbiologie des aliments - Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés - Méthode de routine, <http://www.boutique.afnor.org/norme/nf-v08-408/microbiologie-des-aliments-contrôle-de-la-stabilité-des-produits-appertisés-et-assimilés-méthode-de-routine/article/757270/fa045341>.
- AFNOR. 2011. NF V08-602 - Microbiologie des aliments - Dénombrement des spores dans les produits alimentaires avant traitement d'appertisation par comptage des colonies, <http://www.boutique.afnor.org/norme/nf-v08-602/microbiologie-des-aliments-dénombrement-des-spores-dans-les-produits-alimentaires-avant-traitement-d-appertisation-par-comptage/article/697591/fa169301>.
- André, S., Hedin, 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.

- 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.
- Anonymous. 1997. NOR: AGRG9700991A. Arrêté du 28 mai 1997 relatif aux règles d'hygiène applicables à certains aliments et préparations alimentaires destinés à la consommation humaine. Available on [www.legifrance.gouv.fr](http://www.legifrance.gouv.fr), JORF n°126 du 1 juin 1997 page 8785
- Augustin, J.C., Carlier, V. 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 56, 29-51.
- 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.
- Busschaert, P., Geeraerd, A.H., Uyttendaele, M., Van Impe, J.F. 2011. Sensitivity analysis of a two-dimensional quantitative microbiological risk assessment: keeping variability and uncertainty separated. *Risk Analysis* 31, 1295-1307.
- Codex Alimentarius Commission. 1999. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbial Risk Assessment, CAC/GL-30. FAO edition, Rome, Available at [www.codexalimentarius.org/input/download/standards/357/CXG\\_030e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/357/CXG_030e.pdf).
- 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.
- Ellouze, M., Gauchi, J.-P., Augustin, J.-C. 2010. Global sensitivity analysis applied to a contamination assessment model of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon at consumption. *Risk Analysis* 30, 841-852.
- European Commission. 2003. Risk Assessment of Food-Borne Bacterial Pathogens: Quantitative Methodology Relevant for Human Exposure Assessment, Available at: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out308\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out308_en.pdf).
- Feeherry, F., Munsey, D.T., Rowley, D.B. 1987. Thermal inactivation and injury of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 365-370.
- Fernandez, P.S., Peck, M.W. 1997. Predictive model describing the effect of prolonged heating at 70 to 80 °C and incubation at refrigeration temperatures on growth and toxigenesis by nonproteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection* 60, 1064-1071.

- Frey, H.C., Mokhtari, A., Danish, T. 2003. Evaluation of selected sensitivity analysis methods based upon applications to two food safety process risk models. In: Office of Risk Assessment and Cost-Benefit Analysis, U.S.D.A., (Ed.), Washington, DC.
- Heinrich, H.T.M., Bremer, P.J., Mc Quillan, A.J., Daughney, C.J. 2008. Modelling of the acid-base properties of two thermophilic bacteria at different growth times. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* 72, 4185-4200.
- Iman, R.L., Conover, W.J. 1982. A distribution-free approach to inducing rank correlation among input variables. *Communication in Statistics B11*, 311-334.
- 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.
- Llaudes, M.K., Zhao, L., Duffy, S., Schaffner, D.W. 2001. Simulation and modelling of the effect of small inoculum size on time to spoilage by *Bacillus stearothermophilus*. *Food Microbiology* 18, 395-405.
- Logan, N.A., De Vos, P. 2009. Genus VII. *Geobacillus* Nazina et al. 2001, 442AL. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. Three. The Firmicutes, Second ed. Springer, Dordrecht. 21-128.
- Mataragas, M., Zwietering, M.H., Skandamis, P.N., Drosinos, E.H. 2010. Quantitative microbiological risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers — Specific application to *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat meat products. *International Journal of Food Microbiology* 141, 170-179.
- Membré, J.-M., Kan-King-Yu, D., Blackburn, C.W. 2008. Use of sensitivity analysis to aid interpretation of a probabilistic *Bacillus cereus* spore lag time model applied to heat-treated chilled foods (REPFEDs). *International Journal of Food Microbiology* 128, 28-33.
- Mokhtari, A., Frey, H.C. 2005. Sensitivity analysis of a two-dimensional probabilistic risk assessment model using analysis of variance. *Risk Analysis* 25, 1511-1529.
- Nauta, M.J. 2001. A modular process risk model structure for quantitative microbiological risk assessment and its application in an exposure assessment of *Bacillus cereus* in a REPFED. RIVM, Bilthoven.

- Ng, T.M., Schaffner, D.W. 1997. Mathematical models for the effects of pH, temperature, and sodium chloride on the growth of *Bacillus stearothermophilus* in salty carrots. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1237-1243.
- Ng, T.M., Viard, E., Caipo, M.L., Duffy, S., Schaffner, D.W. 2002. Expansion and validation of a predictive model for the growth of *Bacillus stearothermophilus* in military rations. *Journal of Food Science* 67, 1872-1878.
- Pouillot, R., Delignette-Muller, M.L. 2010. Evaluating variability and uncertainty separately in microbial quantitative risk assessment using two R packages. *International Journal of Food Microbiology* 142, 330-340.
- Pouillot, R., Miconnet, N., Afchain, A.L., Delignette-Muller, M.L., Beaufort, A., Rosso, L., Denis, J.B., Cornu, M. 2007. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in French cold-smoked salmon: I. Quantitative exposure assessment. *Risk Analysis* 27, 683-700.
- Prevost, S., Andre, S., Remize, F. 2010. PCR detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage. *Current Microbiology* 61, 525-533.
- R Development Core Team. 2010. R: a Language and Environment for Statistical Computing (Version 2.12.1), R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at <http://cran.r-project.org/>.
- Pujol, G., Looss, B., Janon, A. 2012. Sensitivity: Sensitivity Analysis. R package version 1.6-1. Available at <http://CRAN.R-project.org/package=sensitivity>
- 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, zT and zpH of *Geobacillus stearothermophilus*. *International Journal of Food Microbiology* 161, 112-120.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P. 1995. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 610-616.
- Saltelli, A. 2002. Making best use of model evaluations to compute sensitivity indices. *Computer Physics Communications* 145, 280-297.
- Thompson, P.J., Thames, O.A. 1967. Sporulation of *Bacillus stearothermophilus*. *Applied Microbiology* 15, 975-979.

Vose, D. 2000. Risk analysis: a quantitative guide. John Wiley, Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto.

Yoo, J.A., Hardin, M.T., Chen, X.D. 2006. The influence of milk composition on the growth of *Bacillus stearothermophilus*. *Journal of Food Engineering* 77, 96-102.

Zwietering, M., Van Gerwen, S.J.C. 2000. Sensitivity analysis in quantitative microbial risk assessment. *International Journal of Food Microbiology* 58, 213-221.

Zwietering, M., Wijtzes, T., De Wit, J.C., van't Riet, K. 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *Journal of Food Protection* 55, 973-979.

### 5.3. Exemple d'un moyen de maitrise de la contamination en spores de lignes industrielles (article 5)

#### Contexte

Suite à l'identification des points de prolifération des spores thermophiles sur les lignes de conserverie (Cf. paragraphe 5.1.1.), l'étape suivante a été de déterminer comment limiter cette prolifération et donc de trouver des moyens de lutte efficaces. Une des premières actions a été de diminuer la prolifération microbienne en réduisant au maximum les conditions environnementales favorables au développement des germes présents sur le process. Pour le paramètre température, si la réflexion était vis-à-vis des germes thermophiles (avec un optimum de croissance de 55°C), les températures des sauces de plats cuisinés ou celles du jus de couverture pour des légumes devaient s'en approcher le moins possible. Dans ce cas, il est important que la température limite de consigne soit supérieure à 70°C. Dans certains matériels, la température peut être considérée a priori comme sans risque vis-à-vis du développement des germes thermophiles comme par exemple le blancheur où la consigne se situe généralement au-dessus de 95°C. Or il peut exister un certain nombre de points où cette température n'est pas aussi élevée comme par exemple si les débordements d'un blancheur ne sont pas parfaitement alignés. Dans ce cas, le point le plus haut du blancheur devient une zone morte où l'eau peut aussi être évacuée et où la température peut descendre dans des plages favorables à la croissance de germes thermophiles. De même, un circuit de recirculation d'eau de blancheur utilisé lors de la campagne des haricots verts mais inutilisé et non déconnecté lors de la campagne des petits pois devient un bras mort où l'eau stagnante peut descendre à 65°C. Dans ces cas, on rentre dans une nouvelle dimension de lutte contre la prolifération microbienne qui correspond à la conception hygiénique du matériel. A ce niveau, aussi bien lors du fonctionnement (limitation des zones favorables aux germes) que lors des étapes de nettoyages (accessibilité), des efforts doivent être fait. Et lorsque les zones sont accessibles aux équipes de nettoyage, il est nécessaire que la procédure soit efficace vis-à-vis de la flore à maitriser. Dans une conserverie, la flore à combattre correspond aux spores bactériennes. Et comme la désinfection quotidienne utilisée est très majoritairement uniquement à base de produits bactéricides pour un certain nombre de raisons (technique, financier mais aussi pour la sécurité du personnel et la protection du matériel), il est apparu primordial que les traitements effectués spécifiquement sur les spores soient efficaces contre celles-ci. Or comme nous l'avons constaté précédemment, les flores des conserveries sont assez spécifiques et tout particulièrement la flore thermophile qui est très thermorésistante (Cf.

paragraphe 5.1.1.). La spore étant un système de protection contre les agressions physiques, il était logique de s'attendre à ce que les espèces d'altération des conserves soient aussi particulièrement chimiorésistantes et encore plus pour les souches isolées d'environnement industriel par rapport aux souches de collections internationales.

### Protocole

Pour cette raison, il a d'abord fallu identifier sur le marché les molécules disponibles et efficaces vis-à-vis des spores. Premièrement, il a été éliminé les substances pouvant conduire à une accoutumance des bactéries à celles-ci comme le sont les ammoniums quaternaires, les phénols et les tensio-actifs amphotères. Il est donc resté les substances qui avaient une action forte et destructive telle le chlore, les aldéhydes ou les agents oxydants non halogènes. Et c'est dans ces 2 derniers types que le glutaraldéhyde et l'acide peracétique ont été sélectionnés pour leur activité sporicide connue. Mais le glutaraldéhyde a l'inconvénient d'être peu stable, ne permettant pas une efficacité homogène. Au contraire, l'acide peracétique, en équilibre avec de l'eau oxygénée, présente de nombreux avantages comme sa facilité d'utilisation avec un temps d'action court pour une action forte.

Des produits du commerce, ayant comme principale molécule active de l'acide peracétique, ont donc été sélectionnés pour être validés non seulement sur des espèces d'intérêt avec des isolats sauvages mais aussi selon des conditions attendues d'utilisation. En effet les normes validant ces actions sporicides utilisaient un protocole trop éloigné des conditions industrielles. Ces normes ne pouvaient donc conclure sur l'efficacité réelle des produits. Pour cela, les espèces *G. stearothermophilus* et *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* ont été sélectionnées en plus de l'espèce *C. sporogenes*, germe avec une résistance thermique proche des germes conseillés dans les normes (germe mésophile strict et germe simulant *C. botulinum*). De plus, les produits ont été testés selon deux protocoles, soit selon les normes avec des cellules en suspension sur lesquelles les temps de contact avec le sporicide sont parfaitement et facilement respectés, soit selon une utilisation réelle, autrement dit, avec un sporicide sous forme de mousse pulvérisée sur des spores adhérentes à des coupons inox notamment en position verticale.

### Résultats

Les résultats obtenus ont confirmé de manière encore plus franche qu'attendue la non correspondance entre l'efficacité mesurée selon les normes et une utilisation industrielle. Les spores des espèces thermophiles sont apparues beaucoup plus résistantes à l'action chimique que les spores de souches mésophiles proposées par les normes. Par exemple, quels que soient

les paramètres testés, les spores de *C. sporogenes* ont toujours été détruites jusqu'au seuil de détection alors que pour les spores des THT, plus les conditions étaient défavorables au traitement chimique, plus l'efficacité était amoindrie. Pour illustrer cela, il peut être cité le passage de spores benthiques à des spores adhérentes ou bien la différence entre une surface horizontale et une verticale qui a pu, dans le cas de *Moorella*, conduire à un produit jugé efficace selon les normes à un produit complètement inefficace dans la réalité.

### Valorisation

Suite à cette étude, les industriels ont pu parler en connaissance de cause avec leurs fournisseurs de désinfectants ou leur prestataire de service de nettoyage. Et une attention toute particulière a été mise en avant sur la validation des sporicides proposés avec notamment le besoin d'une validation à minima sur *G. stearothermophilus*, germe pour lequel une activité significative devait être effective. De même, il a été confirmé que les activités présentées dans les caractéristiques des produits sont bien plus élevées que leur réel pouvoir sur les surfaces à la fois car les germes adhérents sont plus résistants et que les temps de contacts d'un produit sous forme de mousse ne peuvent correspondre au temps demandé.



## Evaluation of Peracetic Acid Sanitizers Efficiency against Spores Isolated from Spoiled Cans in Suspension and on Stainless Steel Surfaces

S. André<sup>(1)\*</sup>, S. Hédin<sup>(1)</sup>, F. Remize<sup>(1,2)</sup> and F. Zuber<sup>(1)</sup>

Journal of Food Protection (2012), 75 (2) 371–375

<sup>(1)</sup> CTCPA Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles, Site Agroparc, ZA de l'aéroport, BP 21 203, F-84 911 AVIGNON cedex 9, France.

<sup>(2)</sup> Present address: Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et Sciences des Aliments, ESIROI, Université de la Réunion, 2 rue Joseph Wetzell, F-97490 SAINTE-CLOTILDE, France.

\* Author for correspondence: Tel +33 (0) 490 84 17 09 ; Fax +33 (0) 490 84 17 26 ; email sandre@ctcpa.org

### Abstract

The aim of this study was to determine the inactivation effect of industrial-formulation peracetic acid biocides on bacterial spores adhering to stainless steel surfaces. A standardized protocol was used to validate biocide activity against spores in suspension. Then in order to validate sporicidal activity under practical conditions, we developed an additional protocol to simulate industrial sanitization of stainless steel surfaces with foam-format sanitizer. Spores were sprayed onto stainless steel using a bioaerosol. This study used three spore-forming bacteria: *Clostridium sporogenes* PA3679, *Geobacillus stearothermophilus*, *Moorella thermoacetica* / *thermoautotrophica*. Sporicidal activity was high on *C. sporogenes* spore suspension, with more than 5-log CFU.ml<sup>-1</sup> destroyed at all liquid biocide contact time. Sporicidal activity was also high on *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* spores for a 30-minutes contact but we found no population reduction for the 5-min contact time except with the highest concentration tested. Foam-format biocide on spores adhered to stainless steel effectively inactivated *C. sporogenes* spores but had a lower decontamination effect for other species. Sanitization was more efficient against *G. stearothermophilus* spores following foam deposition on horizontal steel compared to vertical steel and was inefficient against *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* whatever the position.

These results highlight that the spore decontamination efficiency may be different between spores suspended in aqueous solution compared to spores adhered to a stainless steel surface. Furthermore biocide efficiency still needs to be validated with relevant protocols and bacteria representative of the microbiological challenges and issues affecting the food industry.

**Keywords:** *Geobacillus stearothermophilus*, *Moorella thermoacetica*, *Clostridium sporogenes*, sanitization, surface decontamination, adhesion, spore

## INTRODUCTION

In food processing plants, cleaning and then sanitizing all equipment surfaces with biocides is the primary means of preventing cross-contamination by foodborne pathogens and spoilage microorganisms in food preparation and processing areas.

The bacteria responsible for spoilage of canned food are spore-formers, which makes it vital for the canning industry to make sure all bacterial spores are removed from all equipment surfaces in order to preserve food quality and safety. However, biocides used in routine practice have only weak effects on chemical and heat resistant spore structures (23), creating a need of stronger sporicidal sanitizer. Unfortunately, sanitizer efficiency is routinely tested using *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* or *Clostridium sporogenes* spores as indicator for organisms of concern (2), which are not representative of spore-forming bacterial species usually isolated in canned food processing plants. Thermophilic spore-forming bacteria, which produce most heat resistant spores (18) are responsible for cases of spoilage of low-acid canned food after prolonged incubation at 55°C. Spores from thermophilic species are rarely used to evaluate sporicidal activity (10). Furthermore, for different microbial species and cell states (*i.e.* vegetative cells or spores), sanitization efficiency may also be affected by the nature of the surface location where microorganisms adhere (6). This makes the spore-forming bacteria found in spoiled canned products relevant targets for the evaluation of the sanitization efficiency in canneries. Among these species, *Geobacillus stearothermophilus* is frequently isolated from high-temperature spoiled canned food and is one of the most widely studied microorganisms for the design and validation of heat treatment processes (17). *Moorella thermoacetica* described in canned food spoilage (17), is another suitable bacteria for simulating canning applications. It is an obligate anaerobic spore-forming thermophile that has a displaying high thermal resistance with D values of the spores of up to 111 minutes at 121°C (5). The thermal resistance of these spores demonstrates that they might also survive

standard retorting procedures. Although both cellular states (vegetative form and spore) of spore-forming bacteria can be found in food canning plants, only spores are relevant for disinfection activity. It was shown that planktonic (non-adherent) spores were more sensitive to sanitizers than spores adhering to stainless steel surfaces (21). Among substances with biocidal activity, strong-oxidizer Peracetic Acid (PA) is well-known for its effective sporicidal action against various species, including *B. subtilis*, *C. sporogenes*, *G. stearothermophilus* (11) and *Alicyclobacillus acidoterrestris* (16). PA in aqueous solution is always in a chemical equilibrium with hydrogen peroxide (HP) and acetic acid. Palop *et al.* (12) reported that the combination of PA and HP inactivates enzymes located within intact spores of *B. megatorium*, while Leaper (7) suggested that PA promotes oxidation of cellular material by acting on the cytoplasmic membrane. Finally, Block (4) highlighted the advantage of using PA due to its efficiency on spores at low temperatures and in presence of organic matter.

For these reasons, canners often select industrial PA-based formulations as sanitizer, but commercial product efficiency rarely validated with spore-forming species isolated from processing lines. This study was therefore designed to evaluate the efficiency of two commercial PA-based biocides against spores of concern for the industrial fabrication of low-acid canned products under practical conditions, and regardless of spore heat resistance.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Bacterial strains and culture conditions**

Two strains used in this study were isolated from spoiled low acid canned food after incubation at 55°C and kept in the CTCPA (Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles) collection at -80°C. *G. stearothermophilus* (strain 2804 138) was isolated from cans of green beans. *M. thermoacetica* / *thermoautrophica* (strain 1901 020) was isolated from cans of cooked vegetables. *C. sporogenes* (strain PA3679) was used as a non-toxic surrogate microorganism for *C. botulinum*. *C. sporogenes* and *M. thermoacetica* / *thermoautrophica* were grown anaerobically in Rosenow broth (Biorad, Villeneuve d'Ascq, France) respectability at 37°C for 2 days and at 55°C for 2 days. *G. stearothermophilus* was grown aerobically in Brain Heart Infusion Broth at 55°C for 2 days.

To determine cell populations, a tenfold dilution in Tryptone-Salt (TS) broth (Biokar, Beauvais, France) was heated either for 10 min at 80°C for *C. sporogenes* or for 10 min in boiling water for *G. stearothermophilus* and *Moorella*. Serial dilutions in TS were plated (1

ml) on BCP agar (BromoCresol Purple glucose Agar, Biokar) for *G. stearothermophilus* or modified meat liver glucose agar (meat liver glucose agar supplemented with 2 g/L of yeast extract, Biokar). Plates were incubated at 37°C for *C. sporogenes* and at 55°C for 2 to 5 days for *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautrophica* respectively.

### **Commercial sanitizers tested**

Two commercially available “oxidative type” sanitizers, formulated for the food industry, were used. Active molecules were peracetic acid and hydrogen peroxide. Biocide 1 is used at 0.3% w/v as a biocide while biocide 2 is used at 3% w/v as a sporicide.

### **Spore production**

Spore suspensions were prepared according to French standard method NF T72-231 (1). Briefly, 5 ml of cell suspension were added onto agar media. Aerobic bacteria media composition was beef extract 10 g, yeast extract 2 g, MnSO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O 0.04 g and agar 15 g for one liter. Anaerobic bacteria media composition was tryptone 30 g, glucose 5 g, yeast extract 20 g, sodium thioglycolate 1 g and agar 15 g for one liter. Incubations were continued for 3 days at 55°C for *G. stearothermophilus* and for 3 weeks under anaerobic conditions at 37°C or 55°C, respectively, for *C. sporogenes* and *M. thermoacetica* / *thermoautrophica* respectively. Spores were harvested by adding 15 ml of sterile distilled water then transferring into a sterile centrifugation tube. Suspensions were washed three times by centrifugation at 4000 g for 20 min at 4°C. Final spore pellets were re-suspended in 20 ml of sterile distilled water and heat treated before storage at 4°C until used. The heat treatment was performed in a water bath for 10 min at 80°C for *C. sporogenes* and at 100°C for *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautrophica*. All these concentrated and heat treated suspensions exhibited approximately 10<sup>8</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> for *G. stearothermophilus* or *C. sporogenes* and >10<sup>6</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> for *M. thermoacetica* / *thermoautrophica*.

### **Treatment of planktonic spores**

A modified European standard (NF EN 13704) (2) was used to evaluate sporicidal efficiency. A dilution-neutralization method was used to stop the reaction. Briefly, 1 ml of glucose (10g.l<sup>-1</sup>) used as an interfering substance designed to reduce biocide activity was added to 1 ml of concentrated spore suspension and mixed. After 2 min, 8 ml of sanitizer solution was added

and mixed. After contact exposure time (5 or 30 min), 1 ml of the mix was added to 8 ml of sanitizer inhibitor designed to immediately stop the oxidative chemical reaction (sodium thiosulphate 0.5%, Fisher Scientific, Illkirch, France) and 1 ml of sterile water. Each treatment was performed in triplicate.

### **Preparation of stainless steel plates**

Stainless steel type 316L-grade plates were used at size 20x20cm. Before use, the plates were sterilized in a dry heat oven at 150°C for 4 h. Two successive inoculations were performed by spraying the plates in a sterile environment with 0.5 ml of spore suspension, then drying the plates at room temperature. For each test, ten plates per trial were inoculated and left overnight at room temperature.

### **Treatment of spores on stainless steel plates**

Disinfectant solutions were prepared up to the maximum concentrations for foam-format use as stipulated in the manufacturer's recommendations. For two plates, sterile water was used instead of disinfectant to create control samples. Four inoculated plates were treated with foam obtained from each sanitizer solution. Plates were treated either horizontally or vertically. After exposure at room temperature (30 min), the stainless steel plates were rinsed according to the modified Podolak *et al.* protocol (16). As surfaces in this study are larger than the coupons used by Podolak, five successive rinses were performed with 200 ml instead of 10 ml of sterile water in order to eliminate non-adherent spores. A sponge rehydrated with sanitizer inhibitor (lecithin polysorbate triton X both, Biokar) was then used to recover the spores from the central surface (10 x 10cm) of the stainless steel plates. Sponges were stomached with buffered peptone water (Biokar) before bacterial enumeration.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using XLSTAT software (Addinsoft™ version, Paris, France). The influence of various treatments was investigated ANOVA, followed by a multiple-means comparison procedure using Tukey grouping. All tests were performed with statistical significance set at  $P < 0.05$ .

### **Heat resistance of spore suspension**

Capillary tubes (Ringcaps® Duran®) of capacity 100 µl were filled with 50 µl of spore suspension in phosphate buffer pH 7, sealed and submitted to a heat treatment in a temperature-regulated oil bath. Heat temperatures ranged from 95°C to 105°C for *C. sporogenes*, 110°C to 122.5°C for *G. stearothermophilus* and 120°C to 132.5°C for *M. thermoacetica* / *thermoautrophica*. After heating, the tubes were cooled immediately in water. Both ends of the tubes were cut aseptically and the suspension was flushed out with 3 ml of sterile TS solution. Viable cells were counted as previously described. D-values were estimated from linear portions of plots of the logs of surviving numbers versus time of heating.

## **RESULTS**

This study was designed to evaluate the decontamination effects of two commercial sanitizers against bacterial spores from species found in cases of canned food spoilage. In step 1, we evaluated inactivation of planktonic spores (in aqueous suspension) as described in standard validation procedures. In step 2, we studied spore inactivation according to industrial methods for sanitizer application i.e. foam-format type sanitizer on stainless steel plates presenting adherent spores.

### **Effects of biocides on spore suspensions**

Whatever the biocide used, concentration tested (0.3% to 1.2%w/v for biocide 1, 3% to 6% w/v for biocide 2) and exposure time (5 and 30 min), more than 5-log CFU.ml<sup>-1</sup> of *C. sporogenes* spores were inactivated (data not shown).

Sporicidal efficiencies on planktonic spores of other species are presented in Table 1. A variance analysis was applied with two factors: specie and biocide, to highlight significant effects. The population of inactivated spores increased for every specie and contact time with increasing of biocide concentration. More than 5 log CFU.ml<sup>-1</sup> *G. stearothermophilus* spores were eliminated within 5 min with 1.2% of biocide 1 or 6% of biocide 2. After 30 min of contact, the sanitizer concentrations required to reach the same destruction level decreased to 0.3% and 3% for biocide 1 and 2 respectively. Under the concentrations tested, neither biocide was able to significantly inactivate *M. thermoacetica* / *thermoautrophica* spores within 5 min. After 30 min of exposure, the concentrations of biocide 1 required to reduce

population counts to below detection level were higher than for *G. stearothermophilus*. As a result, a minimum of 0.7% of biocide 1 was required in order to destroy both species populations within 30 min of exposure. For biocide 2, our results concurred with the manufacturer's recommendations for sporicidal action (down to 3% within a 20 min contact time).

**Table 1** Planktonic spore concentration after two species were exposed to various concentrations of the two biocides

Species	Biocide	Biocide Concentration (% W /V)	Spores concentration <sup>a</sup> (log CFU.ml <sup>-1</sup> ) after exposure time		
			5 min	30 min	
<i>G. stearothermophilus</i>	1	0	7.8 A	7.8 A	
	1	0.3	7.9 A	<2.0 <sup>b</sup> B	
	1	0.7	7.6 B	<2.0 B	
	1	1.2	<2.0 C	<2.0 B	
	2	0	6.9 A	6.9 A	
	2	3.0	5.9 B	<2.0 B	
	2	4.5	3.4 C	<2.0 B	
	2	6.0	<2.0 D	<2.0 B	
	<i>M. thermoacetica /thermoautrophica</i>	1	0	5.8 A	5.8 A
		1	0.3	5.9 A	5.0 B
1		0.7	5.8 A	<2.0 C	
1		1.2	nd <sup>c</sup>	nd	
2		0	5.6 A	5.6 A	
2		3.0	5.8 B	<2.0 B	
2		4.5	5.7 AB	<2.0 B	
2		6.0	5.6 AB	<2.0 B	

<sup>a</sup> Values are means of three determinations; <sup>b</sup> Limit of detection; <sup>c</sup> not determined

For each species, biocide and contact time, means followed by the same letter are not significantly different at P > 0.05 (Tukey's Honest Significant Difference Test)

### Effects of biocides on spores adhered to stainless steel plates

Inoculation by spraying resulted in high concentrations of adhered spores on stainless steel plates. Concentrations reached 1 to 5 x 10<sup>6</sup> CFU/100 cm<sup>2</sup> for *G. stearothermophilus* and *C. sporogenes* and 1 to 5 x 10<sup>4</sup> CFU/100 cm<sup>2</sup> for *Moorella thermoacetica / thermoautrophica* in relation with less concentrated spore suspension obtained with this specie.



**Table 2** Adhered spore concentration on vertical *versus* horizontal stainless steel plates after treatment with biocide or water (control)

Species	Position	Biocide	Spore population <sup>a</sup> (log CFU/100cm <sup>2</sup> ) after treatment	
<i>C. sporogenes</i>	Horizontal	Water	6.3	A
	Horizontal	Biocide 1	<1.0 <sup>b</sup>	B
	Horizontal	Biocide 2	<1.0	B
<i>G. stearothermophilus</i>	Horizontal	Water	6.1	A
	Horizontal	Biocide 1	2.1	B
	Horizontal	Biocide 2	3.3	C
<i>M. thermoacetica / thermoautrophica</i>	Horizontal	Water	4.8	A
	Horizontal	Biocide 1	3.9	B
	Horizontal	Biocide 2	3.9	B
<i>C. sporogenes</i>	Vertical	Water	6.3	A
	Vertical	Biocide 1	<1.0	B
	Vertical	Biocide 2	<1.0	B
<i>G. stearothermophilus</i>	Vertical	Water	6.1	A
	Vertical	Biocide 1	5.7	B
	Vertical	Biocide 2	5.2	C
<i>M. thermoacetica / thermoautrophica</i>	Vertical	Water	4.8	A
	Vertical	Biocide 1	4.7	A
	Vertical	Biocide 2	4.8	A

<sup>a</sup> Value are means of four determinations; <sup>b</sup> Limit of detection

For each species and position, means followed by the same letter are not significantly different at P > 0.05 (Tukey's Honest Significant Difference Test)

Table 2 reports the results for inactivation of spores adhered to stainless steel plates by biocide 1 at 1.2% and biocide 2 at 6%. Under planktonic conditions, adhered *C. sporogenes* spores were unable to resist disinfection whatever the conditions used. For *G. stearothermophilus*, both biocide products had a significant sporicidal action in both plate positions. Both biocides achieved in a minimal destruction level of 3 log CFU.unit<sup>-1</sup>(as required for official validation according to European Standards) on horizontal position stainless steel plates spread with *G. stearothermophilus*. However, both biocides achieved less spore destruction (less than 1 log CFU/100cm<sup>2</sup>) on vertical plates. There was a significant effect against *M. thermoacetica / thermoautrophica* spores on horizontal plates but with a decontamination level of only 0.9-log CFU/100cm<sup>2</sup>. With foam deposited on a vertical stainless steel plates, there was no sporicidal activity against *Moorella* spores.



## Heat resistance determination

First-order kinetics were used to calculate the heat resistance parameters, in order to compare the thermal resistance of different genera. *C. sporogenes*, which is a mesophilic specie, forms less heat resistant spores with a D-value at 100°C of 9 min and a Z-value of 7.6°C. In comparison, *G. stearothermophilus* spores classically exhibited a higher heat resistance ( $D_{120^{\circ}\text{C}}=3.1$  min and  $Z=8.6^{\circ}\text{C}$ ). *M. thermoacetica* / *thermoautrophica* proved the most heat resistant specie, with  $D_{120^{\circ}\text{C}}$  reaching 30.4 min and a Z-value of 6.1°C.

## DISCUSSION

In this study, spores in suspension proved to be more sensitive to chemical oxidative treatment than the same spores adhered on stainless steel plates. *C. sporogenes* was not detected above detection limits after disinfection treatment whatever the test performed. For both species of concern for the canning industry (*G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautrophica*), 30 minutes were necessary to achieve more than 5-log CFU.ml<sup>-1</sup> of planktonic spore destruction. The time factor is widely reported as dictating higher biocide efficiencies (8). However, Podolak *et al.* (16) did not describe this trend on *A. acidoterrestris* spore inactivation, but they only tested two different contact times (1 or 2 min). Biocide concentration is the second parameter that directly influences spore inactivation and increasing biocide concentration increases sporicidal efficiency (6). The three species studied here appeared to show differential profiles based on these two parameters. *C. sporogenes* was the most sensitive specie whereas *Moorella* was the most resistant specie.

*C. sporogenes* is well-known to be highly sensitive to low sporicides concentrations (11), but there is no data on the chemical resistance of *Moorella thermoacetica* / *thermoautrophica*. However, the three species could be compared according to their heat resistance. The D-values obtained in this study are similar to those reported in other studies for *Geobacillus stearothermophilus* (19) or *Moorella thermoacetica* / *thermoautrophica* (14). The D-value of 9 min at 100°C founded here for *C. sporogenes* fits with the most representative *C. botulinum* spores obtained in environmental studies (14). For instance, *C. sporogenes* have a D value of 2 min at 107°C while *Moorella* are still able to resist for this same time at 130°C. Therefore, spores displaying the highest heat resistances also display the highest chemical resistances, which is fully consistent with Meyer's observations on intrinsic resistance (9). Blakistone *et al.* (3) also found that heat resistance was connected to chemical resistance. They classified *C. sporogenes* and *C. botulinum* as less resistant to Oxonia-Active® (a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based sanitizer)

than *Bacillus* species but they also found that *G. stearothermophilus* was less resistant than *B. cereus* and *B. subtilis* whereas it demonstrates a higher heat resistance than *Bacillus* spp. These results could be partly explained by the highly hydrophobic nature of *B. cereus* spores, which could trigger spore aggregation resulting in protection against chemical action. Planchon *et al.* (15) demonstrated that the sporulating conditions of *B. cereus*, which confer the highest heat resistance, leads to higher or equal chemical resistances. Finally, the relationship between wet heat and chemical resistance could not be clearly related to spore structure. Setlow (20) reported that the small acid-soluble spore proteins found in spore cores play an important role in protecting microorganisms against heat and chemicals. However, core dehydration is the main factor which contributes to wet heat resistance, whereas coat and inner membrane play a specific role in resistance to chemical attacks.

The focus of this study was not to examine biofilm protection *versus* planktonic cells, which has been well described (13), but instead to test adhered spores *versus* planktonic spores. Simmonds *et al.* (21) reported a significant increase in heat resistance of spores when adhered to stainless steel. Similarly, other authors have shown that aqueous suspensions are more sensitive to chemical treatment than adhered microorganisms (13). Environmental humidity could play a crucial role in this increased resistance as Blakistone *et al.* (3) and Smith and Brown (22) suggested that dry spores are more resistant than aqueous or wet spores.

Other authors have suggested that sporicidal efficiency needs to be assessed based on both the actual conditions of use of the product and the microorganisms targeted (4). In the canned food industry, sporicidal biocide validation should be preferably performed using Highly Heat resistant Spores (HHRs) like *G. stearothermophilus* and *M. thermoacetica* / *thermoautotrophica* instead of species proposed as standards such *Bacilli* and *Clostridi*, which are of less concern in food canning processes (17). Similarly, validations of sporicidal activity on planktonic spores are not relevant when sanitizer biocides are employed in foam forms on industrial equipment.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank M Carlin valuable insight and discussion.

This work was given financial supported by FranceAgriMer.

## BIBLIOGRAPHY

1. Afnor. 1988. Détermination de l'activité sporicide - Méthode par filtration sur membranes. NF T72-231. *In*, Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau.
2. Afnor. 2002. Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements (phase 2, step 1) NF EN 13704. *In*, Chemical disinfectants
3. Blakistone, B., R. Chuyate, D. Kauter, Jr., J. Charbonneau, and K. Suit. 1999. Efficacy of Oxonia Active against selected spore formers. *J. Food Prot.* 62:262-267.
4. Block S.S. (1991) Peroxygen compounds. *In*: Disinfection, Sterilization and Preservation. 4th Ed., (S.S. Block, Ed.), Philadelphia, PA, Lea-Febiger, 167-181.
5. Byrer, D. E., F. A. Rainey, and J. Wiegel. 2000. Novel strains of *Moorella thermoacetica* form unusually heat-resistant spores. *Arch. Microbiol.* 174:334-339.
6. Kreske, A. C., R. Jee-Hoon and L. R. Beuchat. 2006. Evaluation of chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer for effectiveness in killing *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in suspensions, on the surface of stainless steel and on apples. *J. Food Prot.* 69:1892-1903.
7. Leaper, S. 1984. Comparison of the resistance to hydrogen peroxide of wet and dry spores of *Bacillus subtilis* SA22. *J. Food Technol.* 19:695-702.
8. Majcher, M. R., K. A. Bernard, and S. A. Sattar. 2008. Identification by quantitative carrier test of surrogate spore-forming bacteria to assess sporicidal chemicals for use against *Bacillus anthracis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:676-681.
9. Meyer, B. 2006. Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? *Int. J. Food Microbiol.* 112:275-279.
10. Moraes, M. S. V., N. J. Andrade, J. B. P. Chaves, F. J. V. Passos, and L. A. M. Gomide. 1997. Isolation of aerobic mesophilic and thermophilic spores from poultry slaughter equipment and their resistance against chemical disinfectants. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos.* 17:325-329.
11. Mottishaw, J., K. L. Brown, and S. Leaper. 1982. The resistance of bacterial spores to peracetic acid and peracetic acid/other chemical mixtures. *Technical Memorandum, Campden Food Preservation Research Association.* N°300, 85pp.

12. Palop, A., G. C. Rutherford, and R. E. Marquis. 1998. Inactivation of enzymes within spores of *Bacillus megatorium* ATCC 19213 by hydroperoxides. *Can. J. Microbiol.* 44:465-470.
13. Peng, J. S., W. C. Tsai, and C. C. Chou. 2002. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int. J. Food Microbiol.* 77:11-18.
14. Pflug, I. J. 2010. Science, practice, and human errors in controlling *Clostridium botulinum* in heat-preserved food in hermetic containers. *J. Food Prot.* 73:993-1002.
15. Planchon, S., C. Dargaignaratz, C. Levy, C. Ginies, V. Broussolle, and F. Carlin. 2011. Spores of *Bacillus cereus* strain KBAB4 produced at 10 degrees C and 30 degrees C display variations in their properties. *Food Microbiol.* 28:291-297.
16. Podolak, R., P. H. Elliott, B. J. Taylor, A. Khurana, and D. G. Black. 2009. Destruction of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in apple juice on stainless steel surfaces by chemical disinfectants. *J. Food Prot.* 72:510-514.
17. Prevost, S., S. Andre, and F. Remize. 2010. PCR detection of thermophilic spore-forming bacteria involved in canned food spoilage. *Curr. Microbiol.* . 61:525-533.
18. Raso, J., A. Palop, M. Bayarte, S. Condón, and F. J. Sala. 1995. Influence of sporulation temperature on the heat resistance of a strain of *Bacillus licheniformis* (Spanish Type Culture Collection 4523). *Food Microbiol.* 12:357-361.
19. Sasaki, K., H. Shintani, J. Itoh, T. Kamogawa, and Y. Kajihara. 2000. Effect of calcium in assay medium on D value of *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953 spores. *Appl. Environ. Microbiol.* . 66:5509-5513.
20. Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101:514-525.
21. Simmonds, P., B. L. Mossel, T. Intaraphan, and H. C. Deeth. 2003. Heat resistance of *Bacillus* spores when adhered to stainless steel and its relationship to spore hydrophobicity. *J. Food Prot.* 66:2070-2075.
22. Smith, Q. J., and K. L. Brown. 1980. The resistance of dry spores of *Bacillus subtilis* var. *globigii* (NCIB 8058) to solutions of hydrogen peroxide in relation to aseptic packaging. *J. Food Technol.* 15:169-179.

23. Vandekinderen, I., F. Devlieghere, J. Van Camp, B. Kerkaert, T. Cucu, P. Ragaert, J. De Bruyne, and B. De Meulenaer. 2009. Effects of food composition on the inactivation of foodborne microorganisms by chlorine dioxide. *Int. J. Food Microbiol.* 131:138-144.

**6 - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

---

Lors de cette dizaine d'années d'études desquelles 5 projets publiés ont été retenus dans le cadre de ce manuscrit, nous avons pu avancer grandement sur la connaissance en microbiologie des lignes de production de conserves dans le but d'améliorer la maîtrise de la qualité microbiologique des lignes industrielles. Les flores responsables de non-conformité des conserves en France sont principalement des flores d'altération peu étudiées. Il existait donc de nombreuses lacunes dans la connaissance des caractéristiques physiologiques ou de l'écologie de ces microorganismes. Dans un premier temps, il a été nécessaire d'identifier les germes ayant le plus d'impact sur la stabilité de ces produits et il a été développé un outil de détection rapide des germes les plus fréquents. En parallèle, la caractérisation de la résistance thermique ou chimique de ces flores a été effectuée (SporeTraQ™). En dehors du laboratoire, l'analyse des contaminations sur des lignes industrielles a permis d'identifier spécifiquement les zones à risques permettant l'accumulation et/ou la multiplication des spores altérantes.

Cependant, ces études n'ont apporté que des informations quantitatives ou semi-qualitatives suite à des identifications des colonies isolées, c'est-à-dire sur de la flore revivifiable. Cette limite est assumée dans cette thèse car elle reprend des travaux effectués sur plus de 10 ans avec les techniques utilisables à l'époque au laboratoire. Durant ces années, la PCR a été un outil permettant une avancée significative dans la spécificité des réponses. Et même si le brevet de cette invention est tombé récemment dans le domaine public, à la vue du nombre de publications sur de nouvelles amorces développées actuellement, de la simplicité d'utilisation de cette méthode comme de son coût de développement et d'utilisation, cette technique est encore très couramment utilisée et développée de nos jours. Cependant, cette technique basique est limitée, premièrement, au niveau du suivi des flores peu compétitrices car elle a été utilisée post-croissance ou post-isolément. Cette limite a été rencontrée lors de l'étude du genre *Moorella* chez les bactéries sporulantes thermophiles dans les légumes prélevés sur des lignes industrielles (Durand 2014) et/ou dans le cas de flores en faible proportion comme pour les *Clostridium* psychrophiles vis-à-vis des bactéries lactiques sur les lignes de production du foie gras pasteurisé (données personnelles). Deuxièmement, lorsque des isolats ont pu être identifiés et en ne tenant pas compte de l'artéfact dû à l'isolement, il est assez difficile de pouvoir suivre différents souches : cela demande un travail de développement lourd et pas aussi efficace qu'attendu notamment à cause de la disponibilité de génomes séquencés pour les espèces d'altération que nous étudions. Par exemple il n'existe aujourd'hui aucun génome séquencé de l'espèce *G. stearothermophilus*, germe le plus fréquemment utilisé pour valider des traitements de stérilisation.

Suite à cette constatation, il nous a paru impératif qu'un projet de séquençage des principales espèces étudiées au laboratoire soit démarré afin d'avoir les éléments de base à tout nouveau développement d'outils de biologie moléculaire. La diminution des coûts d'une telle prestation aidera à l'augmentation des séquences disponibles dans le futur. De même, le nombre croissant de séquences disponibles dans les banques de données doit permettre la reconstruction *in silico* des voies métaboliques des organismes dans le but d'optimiser la mise au point de milieux sélectifs plus performants permettant leur culture et/ou leur isolement. Ce développement de milieux performants doit rester d'actualité car, même avec les meilleurs outils de biologie moléculaire, l'isolement de souches ou tout simplement le dénombrement spécifique d'espèces d'intérêt sera toujours nécessaire, tout particulièrement pour des analyses de routine. Car les outils de biologie moléculaire ne doivent pas être des outils substitutifs aux méthodes classiques de microbiologie mais des outils complémentaires permettant d'apporter des nouvelles connaissances grâce à de nouvelles possibilités. On peut citer par exemple la possibilité de suivre des souches, ou au moins des génotypes au sein de populations complexes sur un procédé. Dans ce cadre, nous avons testé au sein de l'unité 3 méthodes pour typer *G. stearothermophilus* : séquençage de gène *panC*, REP-PCR et M13-PCR afin de développer un outil performant pour cette espèce (Durand *et al.* 2014). Cette dernière méthode, M13-PCR, a permis de suivre différents génotypes au cours du procédé de fabrication de conserves de légumes. Un premier groupe de génotypes était spécifique d'une campagne de production, c'est-à-dire apporté par les matières premières et un deuxième groupe était commun aux deux campagnes donc probablement lié à une contamination de la ligne de production (Durand *et al.* 2015). Par cet exemple, il apparaît de nombreuses possibilités futures grâce aux multiples méthodes développées ces dernières années qui doivent permettre de pouvoir aider à répondre à de nombreuses interrogations aujourd'hui sans réponse à cause de limites techniques.

Pour en revenir à une des limites constatées dans les études d'écologie de ligne, travail à partir de flores isolées, le point de la difficulté de l'isolement des flores moins compétitrices est rarement discuté dans les articles. Or on peut se poser la question de la perte d'information par rapport à ces flores peu compétitrices, il est donc nécessaire de pouvoir utiliser des méthodes d'identification et de quantification indépendantes de méthodes classiques de culture bactérienne. Pour cela, de nombreuses méthodes performantes à la fois au niveau technique mais aussi économique sont apparues telles que le pyroséquençage ou séquençage à haut débit. Ercolini, dans sa revue (2013), a bien identifié les avantages et les inconvénients du séquençage à haut débit même s'il semble laisser de côté un avantage majeur : c'est une



méthode non dépendante d'une méthode de culture. Les avantages cités dans cette revue sont l'analyse simultanée de plusieurs échantillons, l'identification de la majorité des micro-organismes présents dans l'aliment ainsi que le suivi à la fois d'espèces présentes et de leurs activités. Ces avantages sont peu entamés par les inconvénients identifiés par l'auteur : besoin de bio-informatique et coût important. D'autres biais avaient déjà été identifiés par Feurer *et al.* (2004) : des bases de données fausses, l'utilisation des séquences partielles sous-estimant la divergence, l'évolution de la systématique modifiant certaines espèces, l'existence de plusieurs copies divergentes de séquences d'opérons ribosomiques dans les génomes bactériens qui sont responsables de surestimation de la biodiversité qui peuvent conduire à la description artificielle de nouvelle espèces. Si la profondeur de lecture (encore appelée couverture moyenne) des projets métagénomique permet de mettre en lumière certaines espèces sous représentées ou sujettes aux biais des techniques moléculaires citées ci-dessus, une réflexion reste à mener pour contourner systématiquement les biais, surtout dans les conditions industrielles. Cependant, le coût est devenu accessible pour des échantillonnages de grande envergure et le problème de la bio-informatique est en train de se résoudre par la création d'équipes spécialisées dans ce domaine permettant à tout un chacun d'avoir accès facilement à ce type d'analyse. De même les différents biais sont peu à peu contournés par l'utilisation de techniques de lyse plus performante, d'amorces prenant en compte la diversité bactérienne etc ...

Dans le cadre de nos travaux, c'est donc cette technologie qui a été retenue pour l'étude des clostridies psychrophiles, en particulier lors de l'étude sur le procédé d'élaboration du foie gras pasteurisé. Dans le cas particulier des clostridies pathogènes, et en particulier pour *C. botulinum*, il est particulièrement important de souligner que le risque de présence de toxine botulinique est de fait décorrélé de la viabilité des microorganismes le produisant (ou l'ayant produit). En effet, la toxine peut, dans de rares cas, être détectée même si les bactéries productrices ne sont plus viables au moment du contrôle. Plus généralement, la viabilité d'un pathogène ou d'une flore d'altération donnée ne constitue pas, économiquement parlant du moins, un bon marqueur de niveau de risque, l'industriel cherchant autant que possible à anticiper le risque. Autrement dit, lorsque le pathogène ou la flore d'altération sont présents, il est déjà trop tard. Il apparaît donc important de rechercher des indicateurs de risque de contamination, ceci que la flore « cible » (pathogène ou d'altération) soit viable ou non, et cultivable ou non. Aussi, la détermination de l'occurrence des différentes espèces composant un écosystème est une voie possible pour permettre d'identifier des espèces bioindicatrices. Ce terme et ce concept développé en écologie microbienne environnementale, généralement

utilisé pour des espèces permettant de suivre l'évolution de conditions environnementales ou les modifications des effectifs des autres espèces de l'écosystème, est assez nouveau dans le milieu industriel. Pourtant ce concept ouvre d'importantes perspectives en matière d'anticipation du risque industriel car son objectif clef est d'identifier un niveau de risque de contamination avant que celle-ci n'impacte fortement la production. Un bon bioindicateur doit être assez universel c'est-à-dire être fréquemment observé dans la matrice de production (un contaminant occasionnel ne peut pas constituer un bon bioindicateur). En d'autres termes la matrice de production doit constituer un milieu électif pour le bioindicateur. De plus, sa présence doit être caractéristique d'un défaut particulier de par la corrélation entre le niveau d'occurrence du bioindicateur et le paramètre physico-chimique auquel son niveau d'occurrence est corrélé. Ainsi, dans notre cas de lignes de productions industrielles, une espèce comme *G. stearothermophilus* peut être considérée comme une espèce bioindicatrice du procédé d'appertisation par ses caractéristiques : ubiquitaire et fortement thermorésistante.

Dans le même temps, même si ce point a été peu abordé dans cette thèse, il est nécessaire de continuer à améliorer la connaissance de mécanismes de résistance des bactéries aux traitements qu'ils soient thermiques ou athermiques en tenant compte des conditions de recouvrement des germes ayant survécu à un traitement assainissant et bien entendu de l'évolution des technologies de traitements. La modélisation de l'impact de l'environnement de recouvrement doit permettre de réduire les barèmes basés uniquement sur la destruction des micro-organismes sans tenir compte du stress de l'environnement plus ou moins important, conduisant à la perte de viabilité d'une partie de la population ayant survécu au traitement. De plus, certains traitements athermiques, ou dit doux, sont de plus en plus prisés ces dernières années aussi bien par la communauté scientifique qui publie très massivement, que par les industriels qui commencent à investir dans ce type de technologie comme le sont les hautes pressions. Ces traitements à plus de 2000 à 6000 mbar commencent à se diversifier même s'il reste un gap souvent important entre la réalité et les études scientifiques qui dans un certain nombre de cas, ne sont pas industrialisables du fait du faible rendement de la solution proposée. Et l'application au process des conserves est encore éloignée du fait de la résistance des spores bactériennes aux traitements hyperbariques.

La rentabilité dans le contexte actuel, à la fois financier et de développement durable, conduit à l'utilisation de procédés plus performants à tous les niveaux. L'association d'un aspect de durabilité tout en maintenant la qualité sanitaire des produits est devenue relativement importante dans les développements actuels. De même, les traitements thermiques ayant souvent atteint leur limite d'optimisation ou d'utilisation, un virage est observé avec la

volonté de les réduire afin d'améliorer la qualité organoleptique mais aussi nutritionnelle des produits. Sans aller jusqu'à l'alicament, les conserves, malgré le traitement assainissant important qui leur est appliqué, apportent des nutriments dont la quantité doit être améliorée en réduisant leur dégradation due au traitement thermique. Cela passe par des projets de recherche couplant l'amélioration des qualités sensorielles et nutritionnelles des aliments et maintien de la maîtrise sanitaire dans le cadre d'un principe de bénéfice/risque (projet ANR Ribenut). Dans ce cadre, la mutualisation des expériences et la création de modèles conjoints doivent être généralisées. Malheureusement, cet objectif d'améliorer la qualité nutritionnelle du produit va à l'encontre de certaines idées ou demandes de plus en plus fréquentes d'améliorer théoriquement la maîtrise du risque biologique par l'augmentation du barème thermique. Soit il est demandé d'utiliser des traitements plus importants détruisant plus de micro-organismes soit il est souhaité la stérilité du produit. Sur ce dernier point, il existe certainement une confusion entre les termes stérilisation concernant le procédé et stérilité concernant le produit. Or dans la conserve, c'est une stérilité commerciale qui est demandée et non une stérilité totale.

Il faut noter que dans cette thèse, nous nous sommes principalement focalisés sur la lutte contre les germes sporulants par l'intermédiaire de la température, procédé historique et quasiment unique. Cependant, des technologies émergentes pour le traitement du produit comme les hautes pressions ou la lumière pulsée pourraient permettre de diversifier les moyens de lutte. Dans ce cas, de nouvelles études seront nécessaires pour qualifier les flores pertinentes à suivre pour les industriels vu l'impact différent des nouvelles technologies sur les spores. De même, il est nécessaire de poursuivre l'analyse des flores présentes afin d'observer l'évolution constante des populations microbiennes. Le domaine très spécifique de l'appertisé interdit aussi certaines technologies comme la lutte biologique consistant à mettre en compétition les flores d'altération ou pathogène et des ferments inoculés. Cette biopréservation ne peut être transposée à la fabrication des conserves étant donné que le principe même de la conserve est d'être stable, c'est-à-dire que les germes sont soit détruits soit non capables de se développer dans le produit au contraire des produits pasteurisés réfrigérés.

## 7 - REFERENCES (HORS ARTICLES)

---

- Adam, K.H., Flint, S.H., Brightwell, G. (2010). Psychrophilic and psychrotrophic clostridia: sporulation and germination processes and their role in the spoilage of chilled, vacuum-packaged beef, lamb and venison. *International Journal of Food Science, Technology* 45 (8): 1539-1544.
- Adam, K.H., Flint, S.H., Brightwell, G. (2013). Reduction of spoilage of chilled vacuum-packed lamb by psychrotolerant clostridia. *Meat Science* 93 (2): 310-315.
- Adimpong D.B., Sørensen K.I., Thorsen L., Stuer-Lauridsen B., Abdelgadir W.S., Nielsen D.S., Derckx P.M., Jespersen L. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Bacillus* strains isolated from primary starters for African traditional bread production and characterization of the bacitracin operon and bacitracin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (2): 7903-7914.
- Afnor, 1988. Détermination de l'activité sporicide - Méthode par filtration sur membranes. Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau, NF T72-231. Afnor, Paris
- Afnor, 1997a. Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés - Méthode de référence, Microbiologie des aliments, NF V08-401. Afnor, Paris.
- Afnor, 1997b. Contrôle de la stabilité des produits appertisés et assimilés - Méthode de routine, Microbiologie des aliments, NF V08-408. Afnor, Paris.
- Afnor, 2011. Microbiologie des aliments - Dénombrement des spores dans les produits alimentaires avant traitement d'appertisation par comptage des colonies. NF V 08-602. Afnor, Paris.
- Alderton, G., Chen, J.K., Ito, K.A. (1974). Effect of lysozyme on the recovery of heated *Clostridium botulinum* spores. *Applied Microbiology* 27 (3): 613-615.
- Andersen, A.A., Werkman, C.H. (1940). Description of a dextro-lactic acid forming organism of the genus *Bacillus*. *Iowa State Coll. Journal Science* 14: 187-194.
- 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.
- Anonyme (1955). Décret n° 55-241 du 10 février 1955 portant règlement d'administration publique 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. JO 13-02-1955 p. 1741-1742.

- Anonyme (2014). Acidified and Low-Acid Canned Foods: Draft Guidance for Industry: Submitting Form FDA 2541 (Food Canning Establishment Registration) and Forms FDA 2541d, FDA 2541e, FDA 2541f, and FDA 2541g (Food Process Filing Forms) to FDA in Electronic or Paper Format .
- Ansorge W.J. (2009). Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology* 25 (4): 195-203
- Aouadhi, C., Rouissi, Z., Mejri, S., Maaroufi, A. (2014). Inactivation of *Bacillus sporothermodurans* spores by nisin and temperature studied by design of experiments in water and milk. *Food Microbiology* 38: 270-275.
- 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.
- Bailey, C.P., von Holy, A. (1993). *Bacillus* spore contamination associated with commercial bread manufacture. *Food Microbiology* 10 (4): 287-294.
- Ball, C.O. and Olson, F.C.W. (1957). *Sterilization in Food Technology*. 1st Edition. New York: Mc Graw-Hill Book Company.
- 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.
- Baril, E., Coroller, L., Couvert, O., Leguerinel, I., Postollec, F., Boulais, C., Carlin, F., Mafart, P. (2012). Modeling heat resistance of *Bacillus weihenstephanensis* and *B. licheniformis* spores as function of sporulation temperature and pH *Food Microbiology*, 30: 29-36.
- Bassi, D., Fontana, C., Zucchelli, S., Gazzola, S., Cocconcelli, P.S. (2013). TaqMan real time-quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese. *International Dairy Journal* 33 (1): 75-82.

- Bergère, J.L., Gouet, P., Hermier, J., Mocquot, G. (1968). *Clostridium* of the butyric acid group in dairy products. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille* (19): 41-54.
- Berry, R.N. (1933). Some new heat resistant, acid tolerant organisms causing spoilage in tomato juice. *Journal of bacteriology* 25: 72-73.
- Bevilacqua, A., Corbo, M.R. (2011). Characterization of a wild strain of *Alicyclobacillus acidoterrestris*: heat resistance and implications for tomato juice. *Journal of Food Science* 76 (2): 130-136.
- Bienvenue, A., Piteski, M., Jimenez-Flores, R. (1999). Direct PCR assay of the detection and monitoring of the thermal resistance of *Bacilli* in California milk powder, Third International Symposium on Recombined Milk and Milk Products. Proceedings of IDF Symposium, Penang, Malaysia, p.180.
- Bigelow, W. D. (1921). The logarithmic nature of thermal death time curves. *Journal of Infection and Diseases* 29: 528-536.
- Bocchi, C., Previdi, M.P. (2004). Characterization of butyric clostridia responsible for spoilage of acid products. *Industria Conserve* 79 (2): 175-191.
- Bora, N., Dodd, C., Desmasures, N. Eds (2014). Diversity, dynamics and functional role of actinomycetes on European smear ripened cheeses. Springer, 233 pages.
- Bouvier, Courtois, Gantois, Niel, Richard, Sanalie, Sansoulet (1982). Défauts et altérations des conserves - Nature et origines, 1st ed. AFNOR, Paris.
- Brett, M.M., McLauchlin, J., Harris, A., O'Brien, S., Black, N., Forsyth, R.J., Roberts, D., Bolton, F.J. (2005). A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food. *Journal of Medical Microbiology* 54 (8):769-76.
- Barash, J.R., Hsia, J.K., Arnon, S.S. (2010). Presence of Soil-Dwelling Clostridia in Commercial Powdered Infant Formulas. *Journal of pediatrics* 156 (3), 402-408
- Brightwell, G., Clemens, R., Adam, K., Urlich, S., Boerema, J. (2009). Comparison of culture-dependent and independent techniques for characterisation of the microflora of peroxyacetic acid treated, vacuum-packaged beef. *Food Microbiology*, 26: 283–288.
- Bocchi, C., Previdi, M.P., Miglioli, L. (2004). Heat resistance of butyric clostridia responsible for spoilage of acid products. *Industria conserve*, 79: 259-268.

- Brochet, M., Couvé, E., Zouine, M., Vallaëys, T., Rusniok, C., Lamy, M.C., Buchrieser, C., Trieu-Cuot, P., Kunst, F., Poyart, C., Glaser, P. (2006). Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*. *Microbes Infection* 8 (5):1227-43.
- Broda D.M. (2007). The effect of peroxyacetic acid-based sanitizer, heat and ultrasonic waves on the survival of *Clostridium estertheticum* spores in vitro. *Letters of Applied Microbiology* 45 (3): 336-341.
- Broda D.M., Bell R.G., Boerema J.A. and Musgrave D.R. (2002). The abattoir source of culturable psychrophilic *Clostridium* spp. causing 'blown pack' spoilage of vacuum-packed chilled venison. *Journal of Applied Microbiology* 93 (5): 817-824.
- Broda D.M., Boerema J.A., Bell R.G. (2003). PCR detection of psychrotolerant *Clostridium* spp. causing "blown pack" spoilage of vacuum-packed chilled meats. *Journal of Applied Microbiology* 94 (3): 515, 522.
- Broda D.M., De Lacy K.M., Bell R.G. (1998). Efficacy of heat and ethanol spore treatments for the isolation of psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with the spoilage of chilled vacuum-packed meats. *International Journal of Food Microbiology* 39 (1): 61-68.
- Broda, D.M., De Lacy, K.M., Bell, R.G., Braggins, T.J., Cook, R.L. (1996). Psychrotrophic *Clostridium* spp. associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 335–352.
- Broda, D.M., Lawson, P.A., Bell, G.R., Musgrave, D.R. (1999). *Clostridium frigidicarnis* sp. a psychrotolerant bacterium associated with 'blown pack' spoilage of vacuum-packed meats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49: 1539–1550.
- Broda, D.M., Saul, D.J., Bell, G.R., Musgrave, D.R. (2000a). *Clostridium algidixylanolyticum* sp. nov., a psychrotolerant, xylandegrading, spore-forming bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 623–631.
- Broda, D.M., Saul, D.J., Lawson, P.A., Bell, G.R., Musgrave, D.R. (2000b). *Clostridium gasigenes* sp. nov., a psychrophile causing spoilage of vacuum-packed meat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50: 107–118.



- 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.
- Byrer, D.E., Rainey, F.A., Wiegel, J. (2000). Novel strains of *Moorella thermoacetica* form unusually heat-resistant spores. *Archives in Microbiology* 174: 334-339.
- 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.
- Cazemier, A.E., Wagenaars, S.F.M., 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.
- Cerf, O. (1977). A review. Tailing of survival curves of bacterial spores. *Journal of Applied Bacteriology* 42: 1-19.
- Cerny, G., Hennlich, W., Poralla, K. (1984). Spoilage of fruit juice by bacilli: isolation and characterization of the spoilage microorganism. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 179 (3): 224-227.
- Certel, M., Erem, F., Karakas, B. (2009). Variation of microbiological properties, water activity and ropiness of white and wholemeal breads under different storage conditions. *Gida* 34 (6): 351-358.
- Chavarri, F., Virto, M., Martin, C., Najera, A., Santisteban, A., Barron, L.J.R., De Renobales, M. (1997). Determination of free fatty acids in cheese: comparison of two analytical methods. *Journal of Dairy Research* 64: 445-452
- Chen, L., Coolbear, T., Daniel, R.M. (2004). Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal* 14: 495-504.
- Chen, S., Tang, Q., Zhang, X., Zhao, G., Hu, X., Liao, X., Chen, F., Wu, J., Xiang, H. (2006). Isolation and characterization of thermo-acidophilic endospore-forming bacteria from the concentrated apple juice-processing environment. *Food Microbiology* 23 (5): 439-445.
- Chopra, A.K., Mathur, D.K. (1984). Isolation, screening and characterization of thermophilic *Bacillus* species isolated from dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 57: 263-271.

- Clemens, R.M., Adam, K.H., Brightwell, G. (2010). Contamination levels of *Clostridium estertheticum* spores that result in gaseous spoilage of vacuum-packaged chilled beef and lamb meat. *Letters in Applied Microbiology* 50 (6): 591-596.
- Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., Comi, G. (2004). The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology* 90: 83–91.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R.J., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., Mc Garrell, D.M., Marsh, T., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 37, 141–145.
- Collins M.D., Lawson P.A., Willems A., Cordoba J.J., Fernandez-Garayzabal J., Garcia P., Cai J., Hippe H., Farrow J.A. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic of Bacteriology* 44 (4): 812-826.
- Collins, M.D., Rodrigues, U.M., Dainty, R.H., Edwards, R.A. and Roberts, T.A. (1992). Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. *FEMS Microbiology Letters*, 96: 235–240.
- Collins, N.E., Krischner, L.M., von Holy, A. (1991). Characterization of *Bacillus* isolated from ropey bread, bakery equipment and raw material South African Journal of Science 87: 62-66.
- 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.
- 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.

- Cremonesi, P., Vanoni, L., Silveti, T., Morandi, S., Brasca, M. (2012). Identification of *Clostridium beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum* isolated from silage, raw milk and hard cheese by a multiplex PCR assay. *Journal of Dairy Research* 79 (3): 318-323.
- Danyluk, M.D., Friedrich, L.M., Jouquand, C., Goodrich-Schneider, R., Parish, M.E., Rouseff, R. (2011). Prevalence, concentration, spoilage, and mitigation of *Alicyclobacillus* spp. in tropical and subtropical fruit juice concentrates. *Food Microbiology* 28 (3): 472-477.
- Dasgupta, A.P., Hull, R.R. (1989). Late blowing of Swiss cheese: incidence of *Clostridium tyrobutyricum* in manufacturing milk. *Australian Journal of Dairy Technology* 44 (2): 82-87.
- Deinhard, G., Blanz, P., Poralla, K., Alton, E. (1987). *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Systematic and Applied Microbiology* 10: 47-53.
- Deligaris, N., Papantoniou, D., Zelati, E. (1996). Occurrence and importance of *Clostridium* spp. in the production line of a peach cannery. *Archiv fuer Lebensmittelhygiene* 47 (3): 74-76.
- Delseny, M., Han, B., Hsing, Y. (2010). High throughput DNA sequencing: The new sequencing revolution 179 (5): 407-422.
- de Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H., Whitman, W.B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition, Volume 3: The Firmicutes, Ed. Springer New York p1450
- Dhaisne, A., Guellerin, M., Laroute, V., Laguerre, S., Coccagn-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.
- Diao, M. M., André, S., Membré, J.M. (2014). Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679 International. *Journal of Food Microbiology* 174, 23–30
- Dorn-In, S., Hölzel, C.S., Janke, T., Schwaiger, K., Balsliemke, J., Bauer, J. (2013). PCR-SSCP-based reconstruction of the original fungal flora of heat-processed meat products. *International Journal of Food Microbiology* 162 (1): 71-81.

- Doulgeraki Agapi I., Danilo Ercolini, Francesco Villani, George-John E. Nychas. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology* 157: 130–141.
- 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.
- Durak, M.Z., Fromm, H.I., Huck, J.R., Zadoks, R.N., Boor, K.J. (2006). Development of molecular typing methods for *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. isolated from fluid milk products. *Journal of Food Science* 71: 50-56.
- Durand, L., Planchon, S., Guinebretiere, M.H., Carlin, F., Remize, F., (2015). Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*. *Food Microbiology* 45: 103-110.
- Durand, L. (2014). Ecologie et diversité des bactéries thermophiles formant des spores dans les conserves alimentaires. Thèse Université Montpellier
- Durand, L., Planchon, S., Guinebretiere, M.-H., Carlin, F., Remize, F. (2014). Genotypic and phenotypic characterization of foodborne *Geobacillus stearothermophilus*. *Food Microbiology* 45 (A): 103–110
- El Bisi, H., Ordal, Z. (1956). The effect of certain sporulation conditions on the thermal resistance of *Bacillus coagulans* var. *thermoacidurans*. *Journal of Bacteriology* 71: 1-9.
- Eiroa, M.N., Junqueira, V.C., Schmidt, F.L. (1999). *Alicyclobacillus* in orange juice: occurrence and heat resistance of spores. *Journal of Food Protection* 62 (8): 883-886.
- Ercolini, D. (2013). High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and environmental microbiology* 79 (10): 3148-3155.
- Ercolini, D., Ferrocino, I., Nasi, A., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., La Stora, A., Laghi, L., Mauriello, G., Guerzoni, M.E. and Villani, F. (2011). Monitoring of Microbial Metabolites and Bacterial Diversity in Beef Stored under Different Packaging Conditions. *Applied and environmental microbiology*, 77 (20): 7372.
- Esty, J.R., Meyer, K.F. (1922). The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. XI. *Journal of Infectious Disease* 31: 650-663.

- Everis, L., Betts, G. (2001). pH stress can cause cell elongation in *Bacillus* and *Clostridium* species: a research note. *Food Control* 12 (1): 53-56.
- 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.
- Feng, G., Churey, J.J., Worobo, R.W. (2010). Thermoaciduric *Clostridium pasteurianum* spoilage of self-stable apple juice. *Journal of Food Protection* 73 (10): 1886-1890.
- 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.
- Feurer, C., Irlinger, F., Spinnler, H.E., Glaser, P., Vallaey, T. (2004). Assessment of the rind microbial diversity in a farmhouse-produced vs a pasteurized industrially produced soft red-smear cheese using both cultivation and rDNA-based methods. *Journal of Applied Microbiology* 97 (3): 546-556.
- Fields, M.L., Zamora, A.F., Bradsher, M. (1977). Microbiological analysis of home-canned tomatoes and green beans. *Journal of Food Science* 42 (4): 931-934.
- Fromm, H.I., Boor, K.J. (2004). Characterization of pasteurized fluid milk shelf-life attributes. *Journal of Food Science* 69: 207-214.
- Forquin, M.P., Duvergey, H., Proux, C., Loux, V., Mounier, J., Landaud, S., Coppée, J.-Y., Gibrat, J.-F., Bonnarme, P., Martin-Verstraete, I., Vallaey, T. (2009). Identification of Brevibacteriaceae by multilocus sequence typing and comparative genomic hybridization analyses. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (19): 6406-6409.
- Gandy, A.L., Schilling, M.W., Coggins, P.C., White, C.H., Yoon, Y., Kamadia, V.V. (2008). The effect of pasteurization temperature on consumer acceptability, sensory characteristics, volatile compound composition, and shelf-life of fluid milk. *Journal of Dairy Science* 91: 1769-1777.
- Garaizar, J., Rementeria, A., Porwollik, S. (2006). DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 47: 178-189.

- Garde, S., Arias, R., Gaya, P., Nunez, M. (2011). Occurrence of *Clostridium* spp. in ovine milk and Manchego cheese with late blowing defect: identification and characterization of isolates. *International Dairy Journal* 21 (4): 272-278.
- Garde, S., Gaya, P., Arias, R., Nunez, M. (2012). Enhanced PFGE protocol to study the genomic diversity of *Clostridium* spp. isolated from Manchego cheeses with late blowing defect. *Food Control* 28 (2): 392-399.
- George E.F., Pechman, K.R., Woese, C.R. (1977). Comparative Cataloging of 16s Ribosomal Ribonucleic Acid: Molecular Approach to Procaryotic Systematics", *International Journal of Systematic Bacteriology* 27 (1): 44-57.
- Ghoddusi, H.B., Sherburn, R.E., Aboaba, O.O. (2013). Growth limiting pH, Water activity, and temperature for neurotoxigenic strains of *Clostridium butyricum*. *ISRN Microbiology* 1-6.
- Gilmour, A., Rowe, M.T. (1990). Micro-organisms associated with milk. In: Robinson, R.K. (Ed.), *Dairy Microbiology*. Elsevier Applied Science, London, pp. 37–76.
- 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.
- 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.
- Gombas, D., 1983. Bacterial spore resistance to heat. *Food Technology Nov*, 105–110.
- Gordon, R.E., Raynes, W.C., Pang C.H.N. (1973). The genus *Bacillus*. U.S. Dept. Agr. Handbook N°427.
- Gouet P., Contrepois, M., Corrot, G. (1972). Influences de différents types de lisiers sur la contamination des fourrages et des sols par les spores de *Clostridium*. *Lait* 360, 466.
- Goudkov, A.V., Sharpe, M.E. (1966). A preliminary investigation of the importance of clostridia in the production of rancid flavour in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Research* 33 (2): 139-14
- Gouws, P.A., Gie, L., Pretorius, A., Dhansay, N. (2005). Isolation and identification of *Alicyclobacillus acidocaldarius* by 16S rDNA from mango juice and concentrate. *International Journal of Food Science, Technology* 40 (7): 789-792.

- Grecz, N., Tang, T., Rajan, K., 1972. Relation of metal chelate stability to heat resistance of bacterial spores. In : Halvorson, Hanson, Campbell (Eds.), Spores. Vol. 5. American Society for Microbiology, Washington, pp. 53–60.
- Groenewald, W.H., Gouws, P.A., Witthuhn, R.C. (2009). Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocaldarius* strains from orchard soil and the fruit processing environment in South Africa. *Food Microbiology* 26 (1): 71-76.
- Guericke, S. (1993). Lactate fermenting clostridia in cheesemaking. *Deutsche Milchwirtschaft* 44 (15): 735-739.
- Guinebretiere, M.H., 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.
- Guinebretiere, M.H., 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.
- Guinebretiere, M.H., 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.
- 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.
- Hammer B.W. (1915). Bacteriological studies on the coagulation of evaporated milk. *Iowa Agricultural Experimental Station Research Bulletin* 19: 119-131.
- Hashimoto, T., Black, S., Gerhardt, P., 1960. Development of fine structure, thermostability and dipicolinate during sporogenesis in *Bacillus*. *Canadian Journal of Microbiology* 6, 203–212.



- Hayes, W., White, C.H., Drake, M.A. (2002). Sensory aroma characteristics of milk spoilage by *Pseudomonas* species. *Journal of Food Science* 67 (1): 448-454.
- He, H., Dong, J., Lee, N., Li, Y. (2009). Molecular analysis of spoilage-related bacteria in pasteurized milk during refrigeration by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Food Protection* 72: 572-577.
- Herschleb, J., Ananiev, G., Schwartz, D.C. (2007). Pulsed-field gel electrophoresis. *Nature Protocols* 2: 677-684.
- Hill, B.M., Smythe, B.W. (1994). Progress in Understanding the Behaviour of Thermophilic Bacteria During Milk Powder Manufacture. *Milk Powders for the Future II*. The Dunmore Press Limited, Palmerston North, pp. 19–26.
- Hu, M., Wang, X., Wen, X., Xia, Y. (2012). Microbial community structures in different wastewater treatment plants as revealed by 454-pyrosequencing analysis. *Bioresource Technology*, 117: 72-79.
- Huck, J.R., Hammond, B.H., Murphy, S.C., Woodcock, N.H., Boor, K.J. (2007). Tracking spore-forming bacterial contaminants in fluid milk-processing systems. *Journal of Dairy Science* 90 (10): 4872-4883.
- Huemer, I.A., Klijn, N., Vogelsang, H.W.J., Langeveld, L.P.M. (1998). Thermal death kinetics of spores of *Bacillus sporothermodurans* isolated from UHT milk. *International Dairy Journal* 8: 851-855.
- Id, D., Schaal, E. (1979). Microbiology of UHT milk. *Archiv fuer Lebensmittelhygiene* 30 (1): 17-19.
- Iciek, J., Papiewska, A., Molska, M. (2006). Inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores during thermal processing. *Journal of Food Engineering* 77: 406-410.
- Ikegami, Y., Okaya, C., Sawayama, Z., Shimoda, Y., Mori, D., Oku, M. (1970). Gaseous spoilage by butyric acid anaerobes in canned fruits. I. In canned mandarin orange. *Canners' Journal* 49 (11): 993-996.
- Ingham, S.C., Hassler, J.R., Tsai Y.-W., Ingham, B.H. (1998). Differentiation of lactate-fermenting, gas-producing *Clostridium* spp. isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology* 43 (3): 173-183.
- Innocente, N., Corradini, C. (1996). Use of low ripening temperature to control anomalous fermentations in Montasio cheese. *Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia* 47: 89–102



- Innocente, N., Moret, S., Corradini C., Conte, L.S. (2000). A rapid method for the quantitative determination of short-chain free volatile fatty acids from cheese. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48: 3321–3323
- ITG (1982). *Les butyriques, synthèse bibliographique*. ITG, Bourg en Bresse, FNLP, Paris 180p.
- Ivy, R.A., Ranieri, M.L., Martin, N.H., den Bakker, H.C., Xavier, B.M., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2012). Identification and Characterization of Psychrotolerant Sporeformers Associated with Fluid Milk Production and Processing. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (6): 1853-1864.
- Jackel, S. (1980). Natural breads may cause microbiological problems. *Bakery Production and Marketing* 15(9): 138-142.
- Jimenez-Flores, R. (1999). Survey of source of spore contamination in milk powder. California dairy Research Foundation.
- Kalchayanand, N., Ray, B., Field, R.A., Johnson, M. C. (1989). Spoilage of vacuum-packaged refrigerated beef by *Clostridium*. *Journal of Food Protection* 52 (6): 424-426.
- Kalogridou-Vassiliadou, D. (1992). Biochemical activities of *Bacillus* species isolated from flat sour evaporated milk. *Journal of Dairy Science* 75 (10): 2681-2686.
- 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 (3): 265-272
- 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 (13): 2928-2936.
- Keis, S., Shannen, R., Jones, D.T. (2001). Emended description of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp. nov. and *Clostridium saccharobutylicum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51 (6): 2095-2103.
- Kim, H.-H. Jeong, E.-J., Jeong D.-O., Kim, Y.-S., Shin, D.-H. (2005). Identification, characteristics, and growth inhibition of the strain isolated from spoiled wet noodle. *Food Science and Biotechnology* 14 (4): 461-465.

- Kubo, Y., Rooney, A.P., Tsukakoshi, Y., Nakagawa, R., Hasegawa, H., Kimura, K. (2011). Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (18): 6463-6469.
- Lane, D.J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. Dans : *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY, pp. 115-175.
- 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.
- Lawson, P., Dainty, R.H., Kristiansen, N., Breg, J., Collins, M.D. (1994). Characterization of a psychrotrophic *Clostridium* causing spoilage in vacuum-packed cooked pork: description of *Clostridium algidicarnis* sp. nov.. *Letters in Applied Microbiology*, 19: 153–157.
- le Bourhis, A.G., Saunier, K., Dore, J., Carlier, J.P., Chamba, J.F., Popoff, M.R., Tholozan, J.L. (2005). Development and validation of PCT primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1): 29-38.
- Leguérinel, I., Mafart, P. (2001). Modelling the influence of pH and organic acid type on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* 63: 29-34.
- Leguérinel, 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.
- Leuschner, R.G.K., O'Callaghan, M.J.A., Arendt, E.K. (1998). Bacilli spoilage in part-baked and rebaked brown soda bread. *Journal of Food Science* 63 (5): 915-918.
- Lin, M., Al-Holy, M., Chang, S.S., Huang, Y., Cavinato, A.G., Kang, D.H., Rasco, B.A. (2005). Rapid discrimination of *Alicyclobacillus* strains in apple juice by Fourier transform infrared spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology* 105 (3): 369-376.

- Lopez, M., Mazas, M., Gonzalez, I., Bernardo, A., Gonzalez, J. (1994). Effect of pH and sodium chloride on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Microbiologie - Aliments - Nutrition* 12: 317, 322.
- Lopez-Velasco, G., Welbaum, G.E., Boyer, R.R., Mane, S.P., Ponder M.A. (2011). Changes in spinach phylloepiphytic bacteria communities following minimal processing and refrigerated storage described using pyrosequencing of 16S rRNA amplicons. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 1203-1214.
- Lücking, G, Stoeckel, M, Atamer, Z, Hinrichs, J, Ehling-Schulz, M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 166 (2): 270-279.
- Luera Penal, W.E., de Massaguer, P.R., Quintao Teixeira, L. (2009). Microbial modeling of thermal resistance of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 spores in concentrated orange juice with nisin addition. *Brazilian Journal of Microbiology* 40 (3): 601-611.
- Lusardi, C., Previdi, M.P., Colla, F., Barbieri, G., Bolzoni, L. (2000). Ability of *Alicyclobacillus* strains to spoil fruit juices and nectars. *Industria Conserve* 75 (2): 151-161.
- Lycken, L., Borch, E. (2006). Characterization of *Clostridium* spp. isolated from spoiled processed cheese products. *Journal of Food Protection* 69 (8): 1887-1891.
- Ma M., Boyd J.T., Trinh H.T., Coombs J. W., Fermann G. J. (2007). Fatal myocarditis due to *Clostridium novyi* type B in a previously healthy woman: case report and literature review. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 39 (1): 77-80.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S., Leguerinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull distribution model. *International Journal of Food Microbiology* 72: 107-113.
- Magalhaes, M.M., Massaguer, P.R., Tosello, R.M.T. (1997). Sporulation of *Clostridium pasteurianum* in liver infusion broth and determination of its heat resistance on acidified papaya (*Carica papaya*) pulp (pH 3.8). *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 17 (1): 38-41.
- 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.

- Mardis E.R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetetic* 9: 387-402.
- Marshall, R., Beers, R.J. (1967). Growth of *Bacillus coagulans* in chemically defined media. *Journal of Bacteriology* 94 (3): 517-521.
- 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.
- Martinez Viedma, P., Abriouel, H., Ben-Omar, N., Lopez, R.L., Galvez, A. (2011). Inhibition of spoilage and toxigenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. *Food Control* 22 (5): 756-761.
- Martins, J.H. (1981). Heat resistant mesophilic microorganisms. *Journal of Dairy Science* 64: 149-156.
- Masure O., Bougeard G., Colloc M.L., Bergeret G., Chastel C. (1979). Une nouvelle observation de bactériémie à *Bacillus licheniformis* chez une leucémique. *Médecine et Maladies Infectieuses* 9 (2): 100–102.
- Matteuzzi, D., Annibaldi, S., Sabatini, P. (1972). *Clostridium sporogenes* as a cause of blowing in Grana cheese. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia* 22 (5): 145-154.
- 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.
- 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.
- Mc Bryde C.N., 1911. B.A.I. Bulletin 132 U.S. Dept. Agric.
- Mc Guiggan, J.T.M., Mc Cleery, D.R., Hannan, A., Gilmour, A. (2002). Aerobic spore-forming bacteria in bulk raw milk: factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores. *International Journal of Dairy Technology* 55: 100–107.
- Mc Namara, C.J., Wiebe, D., Gomez, M. (2011). Recovery of *Alicyclobacillus* from inhibitory fruit juice concentrates. *Journal of Food Protection* 74 (8): 1370-1373.

- Mc Naughton C.I., Tessendorf B.A., von Holy A. (1998). Antimicrobial efficacy of preservative combinations in South African brown bread. *Microbios*. 93 (376): 169-78.
- Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W. (1991). Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid products: a review. *Journal of Food Protection* 54: 969-979
- 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.
- 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.
- Mikolajcik, E.M. et Simon, N.T. (1978). Heat resistant psychrotrophic bacteria in raw milk and their growth at 7°C. *Journal of Food Protection* 41: 93-95.
- 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.
- Montville, J.T., Sapers, G.H. (1981). Thermal resistance of spores from pH elevating strains of *Bacillus licheniformis*. *Journal of Food Science*, 46: 1710-1713.
- Moorhead, S.M., Bell, R.G. (1999). Psychrotrophic clostridia mediated gas and botulinal toxin production in vacuum-packed chilled meat. *Letters of Applied Microbiology*. 28 (2): 108-12.
- Mortimer, P., Arnold, C. (2001). FAFLP: last word in microbial genotyping? *Journal of Medical Microbiology* 50, 393-395.
- Morton R.O., Scott, V.N., Bernard, D.T., Wiley, R.C. (1990). Effect of heat and pH on toxigenic *Clostridium butyricum*. *Journal of Food Science* 55 (6): 1725-1728
- Moschonas, G., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., Mc Dowell, D.A. (2009). The effect of heat shrink treatment and storage temperature on the time of onset of "blown pack" spoilage. *Meat Science* 87 (2): 115-118.
- Muir, D.D., Griffiths, M.W., Phillips, J.D., Sweetsur, A.W.M., West, I.G. (1986). Effect of the bacterial quality of raw milk on the bacterial quality and some other properties of

- low-heat and high-heat dried milk. *Journal of the Society of Dairy Technology* 39 (4): 115-118.
- Murphy, P.M., Lynch, D., Kelly, P.M. (1999). Growth of thermophilic spore-forming bacilli in milk during the manufacture of low heat powders. *International Journal of Dairy Technology* 52: 45–50.
- Murray, M.B., Gurtler, J.B., Ryu, J.H., Harrison, M.A., Beuchat, L.R. (2007). Evaluation of direct plating methods to enumerate *Alicyclobacillus* in beverages. *International Journal of Food Microbiology* 115 (1): 59-69.
- Nakajo, M; Moriyama, Y (1991). Distribution of heat resistance parametric values of *Bacillus coagulans* spores. *Journal of Japanese Society of Food Science and Technology* 38 (3): 211-213.
- Nakajyo, M., Ishizu, Y. (1985). Heat resistance of *Bacillus coagulans* spores isolated from spoiled canned low-acid foods. *Journal of the Japanese Society of Food Science, Technology* 32 (10): 725-730.
- 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.
- Nielsen, H.B., Almeida, M., Juncker, A.S., Rasmussen, S., Li, J., Sunagawa, S., Plichta, D.R., Gautier, L., Pedersen, A.G., Le Chatelier, E., Pelletier, E., Bonde, I., Nielsen, T., Manichanh, C., Arumugam, M., Batto, J.M., Quintanilha Dos Santos, M.B., Blom, N., Borruel, N., Burgdorf, K.S., Boumezbour, F., Casellas, F., Doré, J., Dworzynski, P., Guarner, F., Hansen, T., Hildebrand, F., Kaas, R.S., Kennedy, S., Kristiansen, K., Kultima, J.R., Léonard, P., Levenez, F., Lund, O., Moumen, B., Le Paslier, D., Pons, N., Pedersen, O., Prifti, E, Qin, J., Raes, J., Sørensen, S., Tap, J., Tims, S., Ussery, D.W., Yamada, T.; MetaHIT Consortium, Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Bork, P., Wang, J., Brunak, S., Ehrlich, S.D.; MetaHIT Consortium (2014). Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature Biotechnology* 32 (8): 822-888 .
- Nishihara, M., Takahashi, H., Sudo, T., Kyoji, D., Kawahara, T., Ikeuchi, Y., Fujita, T., Kuda, T., Kimura, B., Yanahira, S. (2014). Multilocus variable-number of tandem repeat analysis (MLVA) for *Clostridium tyrobutyricum* strains isolated from cheese production environment. *International Journal of Food Microbiology* 190: 61-65.

- 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.
- Ohtani, K., Hirakawa, H., Paredes-Sabja, D., Tashiro, K., Kuhara, S., Sarker, M.R., Shimizu, T. (2013). Unique regulatory mechanism of sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology* 195 (12): 2931-2936.
- 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.
- Olsen, E. (1944). En sporedannende maelkesyrbakterie *Lactobacillus cereale* (nov. sp.). *Kem. Maanedstidende* 25: 125-130.
- 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.
- Palop, A., Marco, A., Raso, J., Sala, F.J., Condon, S. (1997). Survival of heated *Bacillus coagulans* spores in a medium acidified with lactic or citric acid. *International Journal of Food Microbiology* 38 (1): 25-30.
- 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 (3): 243-249.
- Pang, K., Carroad, P., Wilson, A. (1983). Effect of culture pH on D value, cell growth and sporulation rates of P.A.3679 spores produced in aerobic fermentor. *Journal of Food Science* 48: 467-470.
- Pattison T.L., Lindsay D., Von Holy A. (2003). In vitro growth response of bread-spoilage *Bacillus* strains to selected natural antimicrobials. *Journal of Basic Microbiology* 43 (4): 341-347.
- Peck, M.W., Faribairn, D.A., Lund, B.M. (1992). The effect of recovery medium on the estimated heat-inactivation of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Letters in Applied Microbiology*, 15: 146-151.



- Peng, J., Mah, J.-H., Somavat, R., Mohamed, H., Sastry, S., Tang, J. (2012). Thermal inactivation kinetics of *Bacillus coagulans* spores in tomato juice. *Journal of Food Protection* 75 (7): 1236-1242.
- Pepe, O., Blaiotta, G., Moschetti, G., Greco, T., Villani, F. (2003). Rope-producing strains of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (4): 2321-2329.
- 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.
- 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.
- Perkins W.E. (1964). Production of *Clostridial* spores. *Journal of applied bacteriology* 28 (1): 1-16.
- Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, E., Priest, F.G. (1996). *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46 (3): 759-764.
- Phillips, J.D., Griffiths, M.W. (1986). Factors contributing to the seasonal variation of *Bacillus* spp. in pasteurized dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 61 (4): 2752-85.
- Pichner, R., Ziegler, E., Eckardt, S., Kabisch, J., Hechelmann, H., Gareis, M. (2012). Detection of microorganisms in refrigerated blown pack spoilage. Optimised detection and isolation of *C. estertheticum* and *C. estertheticum*-like organisms in vacuum-packaged beef. *Fleischwirtschaft* 92 (9): 117-124.
- Previdi, M.P., Bocchi, C. (2004). Characterisation of butyric clostridia responsible for spoilage of acid products. *Industria conserve* 79 (2): 175-192
- Previdi, M.P., Colla, F., Vicini, E. (1995). Characterization of *Alicyclobacillus*, a spore-forming thermophilic acidophilic bacterium. *Industria Conserve* 70 (2): 128-132.



- Priest, F.G., Goodfellow, M., Shute, L.A., Berkeley, C.W. (1987). *Bacillus amyloliquefasciens* sp. nov., nom. rev. International Journal of Systematic Bacteriology 37 (1): 69-71.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. (2013). The complex microbiota of raw milk. FEMS Microbiology Reviews 37 (5): 664-698.
- Ralyea, R.D., Wiedmann, M., Boor, K.J. (1998). Bacterial tracking in a dairy production system using phenotypic and ribotyping methods. Journal of Food Protection 61: 1336-1340.
- Ranieri, M.L., Boor, K.J. (2009). Bacterial ecology of high-temperature, short-time pasteurized milk processed in the United States. Journal of Dairy Science 92: 4833-4840.
- Ranieri, M.L., Boor, K.J. (2010). Tracking and eliminating sporeformers in dairy systems. Australian Journal of Dairy Technology 65 (2): 74-80.
- Reginensi, S.M., Gonzalez, M.J., Olivera, J.A., Sosa, M., Juliano, P., Bermudez, J. (2011). RAPD-based screening for spore-forming bacterial populations in Uruguayan commercial powdered milk. International Journal of Food Microbiology 148: 36-41.
- Renco, P. (1942). Ricerche su un fermento lattice sporigeno (*Bacillus thermoacidificiens*). Annal of Bacteriology 2: 109-114.
- 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, zT and zpH of *Geobacillus stearothermophilus*. International Journal of Food Microbiology 161 (2): 112-120.
- Roberts, T.A., Derrick, C.M. (1975). Sporulation of *Clostridium putrefaciens* and the resistance of the spores to heat, gamma-radiation and curing salts. Journal of Applied Bacteriology 38 (1): 33-37.
- Roecken, W., Spicher, G. (1993). Rope-forming bacteria - occurrence, significance and counter measures. Getreide, Mehl und Brot 47 (3): 30-35.

- Rombaut, R., Dewettinck, K., De Mangelaere, G. and Huyghebaert, A. (2002). Inactivation of heat resistant spores in bovine milk and lactulose formation. *Milchwissenschaft* 57: 432–436.
- Ronimus, R.S., Parker, L.E., Turner, N., Poudel, S., Ruckert, A., Morgan, H.W. (2003). A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International Journal of Food Microbiology* 85: 45–61.
- Rose, R., Setlow, B., Monroe, A., Mallozzi, M., Driks, A., Setlow, P. (2007). Comparison of the properties of *Bacillus subtilis* spores made in liquid or on agar plates. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 691-699.
- Rosenberg, E. (2014). The Prokaryotes: Firmicutes and Tenericutes, vol 7. In *The Prokaryotes - 4th Edition*. eds Edward F. DeLong, Stephen Lory, Erko Stackebrandt, Fabiano Thompson. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Rosenkvist, H, Hansen, A. (1995). Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. *International Journal of Food Microbiology* 26 (3): 353-363.
- Rueckert, 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 (3): 263-272.
- Rumeus, I., Turtoi, M. (2013). Influence of sourdough use on rope spoilage of wheat bread. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 19 (1): 94-98.
- Ruusunen, M., Surakka, A., Korkeala, H., Lindström, M. (2012). *Clostridium tyrobutyricum* strains show wide variation in growth at different NaCl, pH, and temperature conditions. *Journal of Food Protection* 75 (10): 1791-1795.
- Sandoval, A.J., Barreiro, J.A., Mendoza, S. (1992). Thermal resistance of *Bacillus coagulans* in double concentrated tomato paste. *Journal of Food Science* 57 (6): 1369-1370.
- Sanger, F., Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 94 (3): 441-448.
- Schadt, E.E., Turner, S., Kasarskis, A. (2010). A window into third-generation sequencing. *Human molecular genetics*, 19: 227-240.

- Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., Heyndrickx, M. (2006). *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *Journal of Applied Microbiology* 101 (3): 542-555.
- 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.
- Schumann, P., Pukall, R. (2013). The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 36: 369-375.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology* 21 (8): 1794-1805
- Silva A.R., Paulo E.N., Sant'Ana A.S., Chaves R.D., Massaguer P.R. (2011). Involvement of *Clostridium gasigenes* and *C. algidicarnis* in 'blown pack' spoilage of Brazilian vacuum-packed beef. *International Journal of Food Microbiology* 148 (3): 156-163.
- Silva, F.V.M., Gibbs, P. (2001). *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in fruit products and design of pasteurization processes. *Trends in Food Science, Technology* 12 (2): 68-74.

- Simon, M., Hansen, A.P. (2001). Effect of various dairy packaging materials on the shelf life and flavor of pasteurized milk. *Journal of Dairy Science* 84 (4): 767-773.
- Splittstoesser, D.F., Churey, J.J., Lee, C Y. (1994). Growth characteristics of aciduric sporeforming bacilli isolated from fruit juices. *Journal of Food Protection* 57 (12): 1080-1083.
- 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.
- Spring, S., Merkhoffer, B., Weiss, N., Kroppenstedt, R.M., Hippe, H., Stackebrandt, E. (2003). Characterization of novel psychrophilic clostridia from an Antarctic microbial mat: description of *Clostridium frigidum* sp. nov., *Clostridium lacusfryxellense* sp. nov., *Clostridium bowmanii* sp. nov. and reclassification of *Clostridium laramiense* as *Clostridium estertheticum* subsp. *laramiense* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1019–1029.
- 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.
- Sturges, W.S., Drake, E.T., (1927). A complete description of *Clostridium putrefaciens* (Mc Bryde). *Journal of bacteriology*, 14 (3): 175-179.
- Sugiyama, H., 1951. Studies on factor affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. *Journal of Bacteriology* 62, 81–96.
- Sutherland, A D, Murdoch, R. (1994). Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. *International Journal of Food Microbiology* 21 (4): 279-292.
- Thompson, J.M., Waites, W.M., Dodd, C.E.R. (1998). Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. *Journal of Applied Microbiology* 85 (3): 481-486.
- Tourasse, N.J., Helgason, E., Klevan, A., Sylvestre, P., Moya, M., Haustant, M., Økstad, O.A., Fouet, A., Mock, M., Kolstø A.B. (2011). Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of MLST, AFLP, and MLEE genotyping data. *Food Microbiology* 28 (2): 236-244.

- Toyoda, S., Kobayashi, Y., Ahiko, K., (1990). Heat resistance of clostridia spores isolated from Gouda cheese. *Japanese Journal of Zootechnical Science* 61 (7): 599-605.
- Townsend, C.T. (1939). Spore-forming anaerobes causing spoilage in acid canned foods. *Journal of Food Science* 4 (3): 231–237.
- Uchida, M., Teramura, H., Kashida, M., Kodaka, H. (2013). Evaluation of a new chromogenic agar medium for *Alicyclobacillus acidoterrestris*. *Biocontrol Science* 18 (2): 95-100.
- Valerio, F., de Bellis, P., di Biase, M., Lonigro, S.L., Giussani, B. (2012). Diversity of spore-forming bacteria and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* as a species frequently associated with the ropy spoilage of bread. *International Journal of Food Microbiology* 156 (3): 278-285.
- van Zuijlen, A., Periago, P.M., Amezcua, A., Palop, A., Brul, S., Fernandez, P.S. (2010). Characterization of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores, putative indicator microorganism for optimisation of thermal processes in food sterilization. *Food Research International* 43: 1895-1901.
- Vanhomwegen, J., Berthet, N., Mazuet, C., Guigon, G., Vallaey, T., Stamboliyska, R., Dubois P., Kennedy, G.C., Cole, S.T., Caro, V., Manuguerra, J.C., Popoff, M.R. (2013). Application of high-density DNA resequencing microarray for detection and characterization of botulinum neurotoxin-producing clostridia. *PLoS One* 8(6): e67510.
- Viedma, P.M., Abriouel, H., Omar, N.B., Lopez, R.L., Galvez, A. (2011). Inhibition of spoilage and toxigenic *Bacillus* species in dough from wheat flour by the cyclic peptide enterocin AS-48. *Food Control* 22: 756-761.
- Walker, M., Phillips, C.A. (2008). *Alicyclobacillus acidoterrestris*: an increasing threat to the fruit juice industry? *International Journal of Food Science, Technology* 43 (2): 250-260.
- Walls, I., Chuyate, R. (1998). *Alicyclobacillus* – historical perspective and preliminary characterization study. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 18 (8): 499-503.
- Walls, I., Chuyate, R. (2000). Isolation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from fruit juices. *Journal of AOAC International* 83 (5): 1115-1120.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., Cole, J.R. (2007). Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261-5267

- Wanilada, R., Tosukhowong, A., Amornpan, K., Sawarot, M., Vethachai, P., Nitsara, K. (2012). Development of bacteria identification array to detect lactobacilli in Thai fermented sausage. *Journal of Microbiological Methods* 91 (3): 341-353.
- Warth, A.D. (1978). Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of *Bacillus* species. *Journal of Bacteriology* 134: 699-705.
- Wei, Q., Wolf-Hall, C., Hall, C.A. (2009). Application of raisin extracts as preservatives in liquid bread and bread systems. *Journal of Food Science* 74 (4): 177-184.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.
- Welsh, J., Mc Clelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- Whiting, R.C., Benedict, R.C., Kunsch, C. A., Blalock, D. (1985). Growth of *Clostridium sporogenes* and *Staphylococcus aureus* at different temperatures in cooked corned beef made with reduced levels of sodium chloride. *Journal of Food Science* 50: 304-307.
- 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.
- Williams, O.B. (1929). The heat resistance of bacterial spores. *Journal of Infectious Disease*, 44: 422-465.
- Wisotzkey, J.D., Jurtshuk, P. Jr, Fox, G.E., Deinhard, G., Poralla, K. (1992). Comparative sequence analyses on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *International Journal of System Bacteriology* 42 (2): 263-269.
- Wisse, C.A., Parish, M.E. (1998). Isolation and enumeration of sporeforming, thermoacidophilic, rod-shaped bacteria from citrus processing environments. *Dairy, Food and Environmental Sanitation* 18 (8): 504-509.
- Woese C.R., Fox, G.E. 1977. The Concept of Cellular Evolution", *Journal of Molecular Evolution* 10 (1): 1-6.

- 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.
- Yang, X., Gill, C.O., Balamurugan, S. (2009). Effects of temperature and pH on the growth of bacteria isolated from blown packs of vacuum-packaged beef. *Journal of Food Protection* 72 (11): 2380-2385.
- York, G.K., Heil, J.R., Marsh, G.L., Ansar, A., Merson, R.L., Wolcott, T., Leonard, S. (1975). Thermobacteriology of canned whole peeled tomatoes. *Journal of Food Science* 40 (4): 764-769.
- Yuan, D.D., Liu, G.-C., Ren, D.Y., Dong, Z., Lu, Z., Kan, C.-P., Yang, Y.-Z., Ma, W., Li, Y. and Zhang, L.B. (2012). A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control* 25: 752-757.
- Zhao, Y., Caspers, M.P.M., Metselaar K.I., de Boer, P., Roeselers, G., Moezelaar, R., Groot, M.N., Montijn, R.C., Abee, T., Kort, R. (2013). Abiotic and microbiotic factors controlling biofilm formation by thermophilic sporeformers. *Applied and Environmental Microbiology* 79 (18): 5652–5660.

## ABSTRACT

---

Microbial contaminants of safety concern represent most of time, in canned food, an industrial risk which is well mastered. However, the spoilage flora, due to its high heat resistance, is responsible for major economic losses. Nevertheless, these bacteria remained poorly characterized. Based on the works realized during last 10 years within the EMaiRIT'S unit of microbiology of the CTCPA (expertise unit of the French Technical Center of the Preservation of Food, focused on Management of Industrial Risk linked to Heat Resistant Spores), the main objective of this thesis were: i) to identify and to characterize, with the aim of its later control, the spoilage spore forming bacteria florae ii) to identify the origin of these florae in canning factories and finally iii) to determine ways of control.

For that purpose, a current inventory of spore forming bacteria in spoiled canned food was made with the cooperation of 122 canning factories over more than 10 years in France. This characterization of the spoilage species allowed the elaboration of a molecular biology tool (SporeTraQ<sup>TM</sup>) for quick identification of these germs or their detection within a complex population. In parallel, the improvement of the knowledge about the heat resistance of these species, main characteristic of the spores, was led. In addition, the chemical resistance of spores was investigated. When identified, we tried to localize these spores on canning factories lines, with several sampling plans, on various vegetables.

At the end, the specific spore forming bacteria related to the industrial canning process was identified, characterized and localized, allowing to improve the microbial risk control either by a more efficient cleaning, and through optimized process schedules. Furthermore, this work was driven within a benefic / risk approach representing the future of the food-processing evolution with improvement of the nutritional quality and the preservation of the sanitary control.

This thesis leans on 5 publications of rank A.

**Keywords:** Spore, Spoilage, Food, Industry, Ecology, Identification



## RÉSUMÉ

---

Si les flores contaminantes représentent la plupart du temps, dans les conserves, un risque industriel aujourd'hui maîtrisé, la flore d'altération, de par sa résistance importante à la température, continue à constituer une cause de pertes économiques majeures. Pourtant cette dernière restait cependant peu caractérisée. En s'appuyant sur les travaux réalisés ces dernières années au sein de l'unité de microbiologie EMaiRIT'S du CTCPA (unité d'Expertise dans la Maîtrise du Risque Industriel en Thermorésistants Sporulants du Centre Technique de la Conservation des Produits Agricoles), les principaux objectifs de cette thèse ont été (i) d'identifier et caractériser, en vue de sa maîtrise ultérieure, la flore d'altération sporulante (ii) d'identifier l'origine de ces flores dans les conserveries et enfin (iii) de déterminer des moyens de maîtrise.

Pour cela, un état des lieux des bactéries sporulantes d'altération des conserves a été effectué avec la collaboration de 122 conserveries sur plus de 10 ans en France. Cette caractérisation des espèces altérantes a permis l'élaboration d'un outil de biologie moléculaire (SporeTraQ<sup>TM</sup>) afin d'identifier rapidement ces germes ou de pouvoir les détecter au sein d'une population complexe. En parallèle, l'amélioration de la connaissance de la thermorésistance de ces espèces, principale caractéristique de la flore sporulante, a été menée. A ce paramètre, il a été associé une relation avec la chimiorésistance des spores. Identifiée, nous avons cherché à localiser cette flore d'altération au sein des usines à l'aide de plusieurs campagnes de prélèvements sur différents légumes.

Au final, la flore spécifique du procédé de fabrication des conserves a été identifiée, caractérisée et localisée en vue d'améliorer la maîtrise du risque microbien soit par une maîtrise des contaminations et/ou un nettoyage plus performant (localisation au niveau d'étapes unitaires, efficacité de molécules sporicides) soit par un barème optimisé (en relation avec la thermorésistance). De plus, ce travail a été conduit au sein d'une approche bénéfique/risque représentant le futur de l'évolution des procédés agro-alimentaires associant amélioration de la qualité nutritionnelle et maintien de la maîtrise sanitaire.

Cette thèse s'appuie sur 5 publications de rang A.

**Mots clés :** Spore, Altération, Conserve, Industrie, Ecologie, Identification