



## Challenge-test et bactéries sporulées

### Quelles pratiques pour la mise en œuvre des challenge-tests « produits » et « procédés » pour les bactéries sporulées ?

Ecrit par : Souad CHRISTIEANS<sup>(a)(\*)</sup>, Marina RIVOLLIER<sup>(a)(\*)</sup>, Annie BEAUFORT<sup>(b)(\*)</sup>, Catherine DENIS<sup>(c)(\*)</sup>, Valérie STAHL<sup>(d)(\*)</sup>

<sup>(a)</sup>ADIV, 10, rue Jacqueline Auriol, ZAC, parc industriel des Gravanches, 63039, Clermont-ferrand cedex, France, souad.christieans@adiv.fr ; marina.rivollier@adiv.fr

<sup>(b)</sup>ANSES, Laboratoire de sécurité des aliments, 23 avenue du Général De Gaulle, 94607, Maisons-Alfort cedex, France, a.beaufort@anses.fr

<sup>(c)</sup>ADRIA Normandie, bd 13 juin 1944, F-14310 Villers Bocage, France cdenis@adrianie.org

<sup>(d)</sup>Aérial, Parc d'innovation, rue Laurent Fries, BP 40443, 67400, Illkirch, France, v.stahl@aerial-crt.com

<sup>(\*)</sup> RMT Réseau Mixte Technologique 07.01 « Expertise pour la détermination de la durée de vie microbiologique des aliments » sous la coordination de l'ACTIA

**Les professionnels sollicitent les centres techniques pour la mise en œuvre de challenge-tests appliqués aux bactéries sporulées afin de valider leur plan de maîtrise sanitaire, leurs procédés de fabrication et d'estimer/valider la durée de vie des aliments qu'ils fabriquent. La norme NF-V01-009 relative aux lignes directrices pour la réalisation des challenge-tests a été rédigée pour les bactéries végétatives mais les bactéries sporulées n'ont pas été considérées. Dans ce contexte, les membres du RMT 07.01 ([http://www.actia-asso.eu/fiche/rmt-3-duree\\_de\\_vie\\_des\\_aliments.html](http://www.actia-asso.eu/fiche/rmt-3-duree_de_vie_des_aliments.html)) ont identifié une action de recensement du savoir-faire des organismes français pratiquant les challenge-tests « sporulés » ainsi que les pratiques publiées dans la littérature scientifique.**

Les bactéries sporulées les plus fréquentes dans les aliments appartiennent aux genres *Bacillus* et *Clostridium*. La majorité des espèces sont des flores d'altération des aliments (coagulation du lait, développement d'odeurs, gonflement des boîtes de conserve et des emballages...); certaines espèces peuvent être pathogènes pour l'homme et agissent par l'intermédiaire de toxines. *Clostridium botulinum*, agent du botulisme, est sans doute l'espèce la plus connue. *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus*, agents de gastro-entérites, sont plus fréquentes mais moins dangereuses.

Les genres *Bacillus* et *Clostridium* sont thermorésistants grâce à la formation de spores qui les rendent capables de (i) supporter des températures supérieures à 100°C pour des durées de traitement de plusieurs minutes, (ii) de résister à la cuisson des aliments et (iii) de s'y multiplier potentiellement durant la conservation. Pour palier à cette problématique, les industriels ont développé des stratégies pour détruire les spores (traitements thermiques comme l'appertisation ou le traitement UHT) ou inhiber le

développement des formes végétatives et sporulées via l'acidification, l'ajout de sel ou d'additifs de conservation.

Actuellement, pour une forte proportion de nouveaux produits, une démarche de respect des caractéristiques sensorielles et nutritionnelles conduit à une cuisson modérée, une réduction ou une suppression des ajouts de sels, d'acides organiques ou d'additifs (démarche Clean Label). Ces modifications de procédés de maîtrise des bactéries sporulées sont potentiellement à l'origine d'altérations des denrées alimentaires. Par ailleurs, en référence au rapport publié par l'Institut National de Veille Sanitaire (INVS) en 2008, *C. perfringens* et *B. cereus* ont été identifiés comme responsables de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC), les situant respectivement au 4ème et 5ème rang des cas d'hospitalisation.

Dans ce contexte, les centres ITAI (Institut Technique Agro-industriel) sont fréquemment sollicités par les professionnels de l'agroalimentaire pour la réalisation de challenge-tests, qui consiste à l'ensemencement artificiel et maîtrisé de l'aliment par une bactérie sporulée, afin de valider leur plan de maîtrise sanitaire, leurs procédés de

fabrication et d'estimer/valider la durée de vie des aliments qu'ils fabriquent. Pour cette mise en œuvre, les centres ont développé leur propre savoir-faire car la norme NF V01-009 (Lignes directrices pour la réalisation des tests de croissance microbiologiques) rédigée pour les bactéries végétatives ne mentionne pas à ce jour de lignes directrices spécifiques aux germes sporulés. Il est apparu nécessaire pour les membres du RMT 07.01 « *Expertise pour la détermination de la durée de vie microbiologique des aliments* » qu'une action soit menée afin de recenser, d'une part, le savoir-faire des organismes français qui pratiquent les challenge-tests « *sporulés* » et, d'autre part les pratiques publiées dans la littérature scientifique. Cette démarche d'enquête a été effectuée en vue d'identifier des lignes directrices pour mieux répondre aux industriels et les accompagner dans leur démarche d'amélioration de la qualité et de la sécurité des aliments.

Pour mener ce travail piloté par l'ADIV, deux axes ont été traités :

Mise en place d'un questionnaire à destination des centres techniques et organismes publics afin de recenser les pratiques et les méthodes employées en termes de challenge-tests sur les bactéries sporulées.

Etat de l'art bibliographique sur un échantillon d'articles scientifiques (cf. références bibliographiques), ciblant la méthodologie de mise en œuvre des challenge-tests en matrice alimentaire.

Le présent article synthétise les différentes données obtenues via les deux sources d'informations citées, en prenant en compte les points suivants : les objectifs visés par les challenge-tests, les matrices alimentaires et les espèces étudiées, l'origine des souches, le protocole de préparation de spores et les milieux de dénombrement, le mode et les taux d'inoculation.

## SYNTHÈSE DE L'ENQUÊTE ET DE LA RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1. Objectifs des challenge-tests et caractéristiques des souches

La synthèse bibliographique et l'enquête menées auprès des organismes identifient les mêmes **objectifs lors de la mise en œuvre des challenge-tests** appliqués aux bactéries sporulées. Dans les deux cas, on recense une dominance d'études sur la caractérisation de la résistance à la chaleur (détermination des paramètres D et z), l'évaluation de l'efficacité de traitements thermiques et la détermination ou la validation de la durée de vie sur un **large panel de catégories d'aliments** : produits carnés (charcuterie cuite), produits laitiers et fromagers (desserts lactés), produits de la mer (surimi), végétaux (purées de légumes), conserves, ovoproduits...

Pour le genre *Bacillus*, l'espèce *B. cereus*, suivie par *B. subtilis* sont les plus étudiées. Dans le cas du genre *Clostridium*, l'espèce *C. perfringens* est la plus représentée dans les challenge-tests effectués pour le compte d'industriels de l'agroalimentaire (hors produits fromagers), alors que quatre espèces font l'objet de la plupart des travaux scientifiques (*C. perfringens*, *C. botulinum*, *C. sporogenes* et *C. tyrobutyricum*). Il est important de souligner que les espèces étudiées sont dans la plupart du temps choisies en fonction de leur prévalence dans les matrices alimentaires. Par exemple, *C. perfringens*

et *C. botulinum* sont les plus étudiées pour les produits carnés et de la mer alors que *C. sporogenes* et *C. butyricum* concernent davantage les produits laitiers et fromagers.

Pour ce qui est de l'**origine des souches** utilisées, les résultats de l'enquête, tout comme la littérature scientifique, montrent qu'elles sont soit issues de collections nationales de référence (ATCC, NTCC, CIP), soit d'origine alimentaire (parfois en lien avec une intoxication alimentaire). Selon les cas, elles sont testées individuellement ou en mélange (en moyenne un mélange de 3 isolats composé de souches de référence et de souches issues d'aliment). La forme sporulée est majoritairement employée pour les challenge-tests alors que 30% des essais d'après l'enquête concerne la forme végétative.

Le **mode d'inoculation** est le plus souvent pratiqué dans la masse du produit (pâté, jambon par exemple) mais des ensemencements en surface sont également possibles selon le produit.

Le **taux d'inoculation** des spores dans les matrices alimentaires est d'environ 6 log<sub>10</sub> sp/g pour tester l'effet assainissant d'un traitement et se situe davantage vers 2-3 log<sub>10</sub> sp/g pour les études de croissance.

### 2. Protocole de préparation de l'inoculum bactérien, de spores & dénombrement

Les tableaux ci-dessous résument la méthodologie relative à la préparation des cultures et des spores pour la réalisation des challenge-tests concernant les espèces

majoritairement étudiées (*Bacillus cereus* et *Clostridium spp.*). Ils permettent d'établir un comparatif des informations issues de l'enquête et de la littérature.

**Tableau 1.** Les différentes étapes du protocole de production de spores pour *Bacillus cereus*

|  | Questionnaire - Enquête  | Littérature   |
|--|--|---|
| Mise en culture  | En majorité: <b>BHI</b> ( <i>Brain Heart Infusion</i> )<br>Suivi par: <b>bouillon nutritif</b><br>Incubation en aérobiose: <b>30°C – 24h</b>   |   |
|  |  | - 30% des cas : <b>J-Broth</b> (10)<br>Ce milieu est recommandé pour cultiver les espèces de <i>Bacillus</i> et notamment <i>B. cereus</i> .<br><i>Composition pour 1 L</i> : 5 g peptone, 15 g extrait de levure, 3 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 g glucose, ajusté à un pH 7.2. Le glucose est ajouté après passage du milieu à l'autoclave (20 min, 121°C).<br>- Incubation parfois à 37°C |
| Conditions de sporulation                              | <b>Milieu majoritairement employé:</b> milieu nutritif non spécifique à base d'agar supplémenté avec au moins du MnSO <sub>4</sub> et CaCl <sub>2</sub><br><b>Incubation:</b> 30°C ou 37°C   |   |
|  | <b>Durée de sporulation :</b><br><b>3 à 5 jours</b>  | <b>Durée de sporulation:</b><br><b>4 à 7 jours</b> ou jusqu'à obtention d'un minimum de 90% de spores   |
|  | Phase de sporulation souvent validée par observation microscopique<br>(+ coloration Gram ou au vert de malachite)  |   |
| Récupération<br>Conservation<br>Inoculation des spores | <b>Lavage/Centrifugation successifs dans de l'eau distillée</b> (vitesse et nombre variables d'une étude à une autre, d'un centre à un autre)  |   |
|  | Trois temps possibles d'inoculation recensés :<br>Inoculation immédiate du produit,<br>Application d'un choc thermique (ou traitement à l'éthanol) avant inoculation,<br>Application d'un choc thermique, puis conservation pour une durée (pas spécifiée, très variable : une semaine à plusieurs semaines) avant inoculation dans le produit.<br><b>Choc thermique variable</b> (70°C/15 min ou 80°C/10 min)<br><b>Conservation des spores généralement à 4°C (eau distillée/ultra pure)</b> |   |
|  |  | Conservation dans du tampon phosphate<br>ou<br>Peptone sel à 4°C  |
| Milieus de dénombrement                                | Réalisation d'un dénombrement de la matrice inoculée avant et après le choc thermique avec emploi de milieux sélectifs (Mossel, Compass Cereus...) ou non (PCA (Plate Count Agar) par exemple...)  |   |

**Tableau 2.** Les différentes étapes du protocole de production de spores pour le genre *Clostridium*

|  | Questionnaire - Enquête   | Littérature  |
|--|---|--|
| Mise en culture  | Majorité des cas: <b>bouillon thioglycolate</b><br>Incubation en aérobiose: <b>37°C – 24h</b>   |  |
|  | Milieu « interne/maison »   | Bouillon RCM (Reinforced <i>Clostridium</i> Medium) - 30°C   |
| Conditions de sporulation                                | <b>Prédominance des milieux :</b> Duncan Strong - <b>DS</b> (16), Duncan Strong modifié – <b>mDS</b> (24)<br><i>(ex : remplacement de l'amidon par du raffinose + caféine)</i><br><i>Composition par Litre :</i> 15g peptone, 4g extrait de levure, 10g hydrogénophosphate disodique, 4g D- Raffinose, 1g thioglycolate de sodium – pH final : 7.8 +/- 0.2.<br><b>Autres :</b> bouillons avec des compositions variables<br><b>Incubation en anaérobiose (37°C)</b> |  |
|  | <b>Durée de sporulation:</b><br><b>5 à 7 jours</b>  | <b>Durée de sporulation:</b><br><b>24h</b> pour les milieux <b>DS et mDS</b><br><b>7 à 10 jours</b> avec les autres milieux de sporulation |
|  | Contrôle de la formation de spores par <b>observation au microscope</b>   |  |
| Récupération/<br>Inoculation des spores/<br>Conservation | <b>Lavage/Centrifugation successifs dans de l'eau distillée</b> (vitesse et nombre variable d'une étude à une autre, d'un centre à un autre)  |  |
|  | Trois stades possibles d'inoculation recensés :<br>inoculation immédiate du produit,<br>application d'un choc thermique (ou traitement à l'éthanol) avant inoculation,<br>application d'un choc thermique, puis conservation pour une durée variable avant inoculation dans le produit,<br><b>Choc thermique variable</b> (70°C/15 min ou 80°C/10 min),<br><b>Conservation des spores généralement à 4°C (eau distillée/ultra pure).</b>                            |  |
| Milieux de dénombrement                                  | Réalisation d'un dénombrement de la matrice inoculée avant et après le choc thermique avec emploi de milieux sélectifs (RCA, TSC ( <i>C. perfringens...</i> ) ou non (BHI...)).   |  |

## CONCLUSION

Ce travail de synthèse a mis en évidence de nombreux points communs entre les sources bibliographiques et les pratiques des centres techniques. En effet, le protocole suivi par les centres techniques découle d'un savoir-faire ayant comme base la littérature scientifique et adapté selon les lignes directrices de la norme NF V 01-009.

D'un point de vue méthodologique (mise en culture des souches, protocole de sporulation, conservation, récolte et ensemencement des spores...), les informations issues de la bibliographie et de pratiques des centres techniques dégagent des questionnements qui permettent d'envisager des perspectives de travail. Un sous-groupe de travail élargi a été mis en place au sein du RMT début 2011 afin d'identifier les axes prioritaires à développer :

- la mise en place d'un protocole standard en vue de la réalisation d'un essai inter-laboratoires entre les organismes mettant en œuvre les challenges-tests des bactéries sporulées.
- la proposition de rédaction de lignes directrices pour la réalisation des challenge tests appliqués aux sporulés.
- l'organisation d'une réflexion sur le développement de travaux complémentaires en cohérence avec les attentes des organismes concernés. Pour ce dernier point, les organismes restent en effet confrontés à des questionnements lors de la mise en œuvre d'un challenge-test avec des bactéries sporulées. On peut ainsi mentionner (i) les conditions opératoires de la phase de sporulation, (ii) la reproductibilité/répétabilité des essais, (iii) les conditions d'inoculation des aliments.

## Remerciements :

L'ADIV tient tout particulièrement à remercier :

- L'ACTIA (organisme d'affiliation du RMT) pour son soutien financier pour la réalisation de ce projet.
- Les organismes ayant répondu à l'enquête (ADRIA-Normandie, Aériale, Anses, CTCPA, IFIP).

## Bibliographie

- "Bactéries sporulées et sécurité des aliments". (1998). Document de l'INRA.
- Claire B., Smith J. P., El- Khoury W., Cayouette B., Ngadi M., Blanchfield B., Austin J. W. (2004).** "Challenge studies with *Listeria monocytogenes* and proteolytic *Clostridium botulinum* in hard-boiled eggs packaged under modified atmospheres". *Food Microbiology* 21: 131-141.
- Bogovic Matijasic B., Koman Rajsp M., Perko B., Rogelj I. (2007).** "Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*." *International Dairy Journal* 17:157-166.
- Broda D.M., De Lacy K.M., R. Graham Bell (1998).** "Efficacy of heat and ethanol spore treatments for the isolation of psychrotropic *Clostridium spp.* associated with the spoilage of chilled vacuum-packed meats." *International Journal of Food Microbiology* 39:61-68.
- Broussolle V., Gauillard F., Nguyen-The C., Carlin F. (2008).** "Diversity of spore germination in response to inosine and L-alanine and its interaction with NaCl and pH in the *Bacillus cereus* group". *Journal Applied Microbiology* 105:1081-1090.
- Byrne B., Dunne G. et al. (2006).** "Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll." *Food Microbiology* 23(8): 803-808.
- Byrne B., Lyng J. G. et al. (2010)** "Radio frequency heating of comminuted meats - considerations in relation to microbial challenge studies." *Food Control* 21(2): 125-131.
- Carlin F., Fricker M. et al. (2006).** "Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group." *International Journal of Food Microbiology* 109(1-2): 132-138.
- Chandrakant A., Labbé R., (2009)** "Survival during cooking and growth from spores of diarrheal and emetic Types of *Bacillus cereus* in Rice" *Journal of Food Protection.*, 72 (11): 2386-2389.
- Claus D. & Berkeley R. C. W. (1986).** Genus *Bacillus* Cohn 1872. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1105-1140. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- "Comprehensive reviews in food science and food safety" —Vol. 2 (Supplement), Chapter VI Microbiological Challenge Testing (2003).
- Coroller L., Leguérinel I. and Mafart P. (2001)** "Effect of water activities of heating and recovery media on apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores" *Applied Environmental Microbiology* 67(1) : 317-322.
- De Jong A.E.I., Beumer R.R., Rombouts F.M. (2002).** "Optimizing sporulation of *Clostridium perfringens*". *Journal of Food Protection* 65, 1457-1462.
- Del Torre M., Della Corte M., Stecchini M.L. (2001).** "Prevalence and behaviour of *Bacillus cereus* in a REPFED of Italian origin". *International Journal of Food Microbiology* 63: 199-207.
- Duncan C.L., Strong D.H. (1968).** "Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*". *Applied Microbiology* 16: 82-89.
- Fernández A., Salmerón C. et al. (1999).** "Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*." *Trends in Food Science & Technology* 10 (4-5): 158-162.
- Gao Y.L., Ju X.R. (2008).** "Exploiting the combined effects of high pressure and moderate heat with nisine on inactivation of *Clostridium botulinum* spores." *Journal of Microbiological Methods* 72:20-28.
- Grande M. J., Lucas R. et al. (2006).** "Inhibition of toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48." *International Journal of Food Microbiology* 106(2): 185-194.
- Granum PE. (1997).** *Bacillus cereus* in "Food microbiology, Fundamentals and Frontiers", Doyle MP, Beuchat L.R., Montville T.J. Eds, ASM Press, Washington DC, pp. 327-336.
- Gounina-Allouane R., Broussolle V. et al. (2008).** "Influence of the sporulation temperature on the impact of the nutrients inosine and l-alanine on *Bacillus cereus* spore germination." *Food Microbiology* 25(1): 202-206.
- Hauschild A.H.W., Hilsheimer R. (1977).** "Enumeration of *Clostridium botulinum* spores in meats by a pour plate procedure." *Canadian Journal Microbiological* 23, pp 829-832.
- Hyttiä-Trees E., Skyttä E., Morkkila M., Kinnunen A., Lindström M., Lähteenmäki L., Ahvenainen R. and Korkeala.H. (2000).** "Safety evaluation of sous vide-processed products with respect to nonproteolytic *Clostridium botulinum* by use of challenge studies and predictive microbiological models". *Applied and Environmental Microbiology* 66: 223-229.
- Juneja V.K. (2006).** "Delayed *Clostridium perfringens* growth from a spore inocula by sodium lactate in *sous-vide* chicken products". *Food Microbiology* 23: 105-111.
- Juneja V. K., Call J. E. and Miller. A. J. (1993).** "Evaluation of methylxanthines and related compounds to enhance *Clostridium perfringens* sporulation using Duncan and Strong medium". *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology.* 2:203-218.

**Juneja V.K., Marks H., Huang L., Thippareddi H. (2010).** "Predictive model for growth of *Clostridium perfringens* during cooling of cooked uncured meat and poultry". Food Microbiology. Sous presse.

**Leguerinel I. and Mafart P. (2001).** "Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores". International Journal of Food Microbiology 63(1-2): 29-34

**Le Marc Y., Plowman J., Aldus C.F., Munoz-Cuevas M., Baranyi J., Peck M.W. (2008).** "Modelling the growth of *Clostridium perfringens* during the cooling of bulk meat". International Journal of Food Microbiology 128: pp 41–50.

**Lund BM, Notermans SHW. (1993).** Potential hazards associated with REPFEDs. in "*Clostridium botulinum*, ecology and control in foods", Hauschild AHW et Dodds KL Eds, Marcel Dekker, New-York, pp. 279-303.

**Macura D., McCannel A., Z.C. Li. M. (2001).** "Survival of *Clostridium botulinum* in modified atmosphere packaged fresh whole North American ginseng roots". Food Research International 34:123-125.

**Pinon A., Zwietering M., Perrier L. et al. (2004).** "Development and validation of experimental protocols for use of cardinal models" for prediction of microorganism growth in food products" Applied Environmental Microbiology 70: 1081-1087.

**Rajkovic A., Uyttendaele M. et al. (2005).** "Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree." Food Microbiology 22(2-3): 189-197.

**Stewart G.S., Johnstone K., Hagelberg E., Ellar D.J. (1981).** "Commitment of bacterial spores to germinate. A measure of the trigger reaction". Biochemical Journal. 198(1): 101-106.

**Tholozan J.L., Carlin F., Fach P., Ploumeyrol M. (1997).** "Bactéries anaérobies strictes et hygiène des aliments. Bulletin de la Société Française de Microbiologie", 12, (1) : 48-56.

**Ushijima T., Sugitani A., Ozaki Y. 1987.** "A pair of semisolid media facilitates detection of spore and enterotoxin of *Clostridium perfringens*". Journal of Microbiological Methods 6: 145–152.

**Valero M., Fernández P. S. et al. (2003).** "Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates." International Journal of Food Microbiology 82(1): 71-79.

**Valero M., Leontidis S. et al. (2000).** "Growth of *Bacillus cereus* in natural and acidified carrot substrates over the temperature range 5-30°C." Food Microbiology 17(6): 605-612.

**Van Opstal I., Bagamboula C.F., Vanmuysen S.C.M., Wuytack E.Y., Michiels C.W. (2004).** "Inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk by mild pressure and heat treatments". International Journal of Food Microbiology 92 :227- 234.