# THESE

Présentée devant L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE U.F.R. SCIENCES ET TECHNIQUES

> Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE Mention Microbiologie

> > Par
> > Louis COROLLER

# « ETUDE DES FACTEURS NON THERMIQUES

# AGISSANT SUR LA DECROISSANCE

# **MICROBIENNE ET MODELISATION »**

Soutenue le 22 septembre 2006 devant la commission d'examen :

Dr. M. L. Delignette-Muller	Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon	Rapporteur
Pr. J. Van Impe	Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Dr. D. Sohier	Ingénieur de Recherche, ADRIA Développement	Examinateur
Dr. F. Carlin	Directeur de Recherche, INRA	Examinateur
Dr. E. Mettler	Ingénieur de Recherche, SOREDAB	Examinateur
Pr. P. Mafart	Université de Bretagne Occidentale	Examinateur
Pr. I. Leguérinel	Université de Bretagne Occidentale	Invité

# THESE

Présentée devant L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE U.F.R. SCIENCES ET TECHNIQUES

> Pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE Mention Microbiologie

> > Par
> > Louis COROLLER

# « ETUDE DES FACTEURS NON THERMIQUES

# AGISSANT SUR LA DECROISSANCE

# **MICROBIENNE ET MODELISATION »**

Soutenue le 22 septembre 2006 devant la commission d'examen :

Dr. M. L. Delignette-Muller	Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon	Rapporteur
Pr. J. Van Impe	Université Catholique de Louvain	Rapporteur
Dr. D. Sohier	Ingénieur de Recherche, ADRIA Développement	Examinateur
Dr. F. Carlin	Directeur de Recherche, INRA	Examinateur
Dr. E. Mettler	Ingénieur de Recherche, SOREDAB	Examinateur
Pr. P. Mafart	Université de Bretagne Occidentale	Examinateur
Pr. I. Leguérinel	Université de Bretagne Occidentale	Invité

La thèse « *Etude des facteurs non thermiques agissant sur la décroissance microbienne et modélisation* » a été réalisée au sein du Laboratoire de Microbiologie appliquée de Quimper, en collaboration avec *ADRIA développement* et *SOREDAB*. Ces travaux ont été financés par l'association de Recherche Ultra propre, Nutrition, Industrie, Recherche, représentée par la SOREDAB, dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche et par le *Ministère de l'Agriculture et de la Pêche* par le biais d'un programme de Recherche « *Aliment Qualité Santé* », convention R02/05.

## **Remerciements**

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et toute ma reconnaissance au Professeur Pierre MAFART, qui a dirigé ces recherches. Je le remercie pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées lors de la réalisation de ces travaux. Nos échanges se sont toujours révélés fructueux et formateurs pour moi, je lui suis infiniment reconnaissant de m'avoir fait profiter de ses connaissances et de son expérience.

J'adresse également toute ma gratitude au Professeur Jan Van IMPE et au Docteur Marie-Laure DELIGNETTE-MULLER qui me font l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je les remercie vivement d'avoir accepté de corriger et d'évaluer ce travail.

*Je tiens à remercier également Monsieur Frédéric Carlin pour avoir accepté d'être membre du jury, et d'avoir soutenu ce travail par le biais de SYM'PREVIUS.* 

Mes remerciements les plus sincères vont à Eric METTLER, je le remercie pour avoir accompagné ce travail, pour le temps qu'il m'a consacré et nos discussions enrichissantes. Mes remerciements vont également à tous les membres de la SOREDAB qui m'ont consacré de leur temps.

A Dominique THUAULT, tous mes remerciements d'avoir initié ce projet de thèse et collaboré à ce travail. Merci à Danièle Sohier, pour avoir accepté d'être membre du jury. Je tiens à Vous remercier tous les deux, ainsi que toute l'équipe de l'ADRIA pour mon agréable passage dans vos locaux.

Je remercie Ivan LEGUERINEL pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire, le temps qu'il m'a consacré et les conseils qu'il m'a prodigué.

Merci à Isabelle ALBERT et Jean-pierre GAUCHY pour leur expertise en statistiques et les nombreux « cours » par téléphone, ainsi qu'à Messieurs Michel HERBRAUD et Georges ROBREAU pour leurs conseils sur la physiologie bactérienne.

Ce travail a été parrainé par SYM'PREVIUS, je remercie Gilbert DELESPAUL, Ségolène HENRI-DUBERNET et Jacques POURQUIE, pour avoir fait partie du comité de pilotage de ce projet, et à tous les participants du groupe de travail dit « d'appui technique », pour les différentes réunions toujours enrichissantes et pour avoir suivi ce travail.

Même s'il s'agit aujourd'hui de la thèse, toute ma reconnaissance va à Olivier CERF, Moez SANAA, Jean-Christophe AUGUSTIN et toute l'équipe de l'ENVA pour mon pré-doc, qui m'a beaucoup apporté pour réaliser ce travail.

Un grand Merci, à Aurélie BOUVET, Emmanuelle COCHE, Mélanie MARCHADOUR, Sophie MARQUIS, Séverine PLUCHET, et Patrice BERTHELOM pour avoir collaboré à ce travail et avoir été des stagiaires exemplaires.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'IUT et de l'IUP pour leur accueil chaleureux, pour avoir permis la réalisation de se travail dans une ambiance inoubliable, et plus particulièrement aux membres du LUMAQ, Emile BELIARD, Sophie CLIQUET, Denis DE LABROISE, Christine LE BOULAY, Anne Gabrielle MATHOT, Patrick LE CHEVALIER, Sabine STACHOWSKI, Diane DEFER, Hana BEN YAGHLANE, Myriam DUPUIS, Estelle BELLANGER, et Anne LEVANT. Je tiens à remercier aussi Nicolas et Stéphanie SAVY pour avoir respectivement collaboré à ce travail et partagé son bureau.

Merci à Marie-Luce, Mariam, Yannick, et Olivier pour leur amitié et les pauses café-clope(s).

Merci à toute ma famille et en particulier à mes parents, pour votre soutien et vos encouragements...

A Elina et Augustin, un grand merci pour avoir supporté ma mauvaise humeur, m'avoir sorti la tête de la thèse, et pour tout ce que vous m'apporté chaque jour.

A Julie : MERCI !! Pour ton soutien et tes encouragements quotidiens, ta patience, ta disponibilité et pour avoir accepté tant de sacrifices ces dernières années.

# TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1         L'INACTIVATION NON THERMIQUE BACTERIENNE : ETAT DES LIEUX       3         1.Le stress bactérien       3         1.1. Le stress acide       3         1.1. Le stress acide us ares acide sur la vitess d'inactivation.       9         1.2. Influence du stress acide sur la vitess d'inactivation.       9         1.2. Le stress osnotique       15         1.2.1. Dommages et mécanismes de résistance au stress osnotique       15         1.2.2. Influence de la température lors d'un stress       19         1.3. Influence de la température lors d'un stress       21         1.3.2. Influence de la température sur la vitesse d'inactivation.       26         2.1. Modélisation du stress non thermique.       26         2.1.1. La cinétique d'ordre un : un cas particulier.       26         2.1.1. La cinétique d'ordre un : un cas particulier.       26         2.1.1. Activité de l'eaus un la vitesse d'inactivation.       33         2.1.2. Modélisation des courbes de survie       26         2.1.3. Modéles basis sur la distribution de Weibull.       31         2.1.4. Modéles basis un la distribution de Weibull.       33         2.1.5. Modéles basis un la distribution de Weibull.       33         2.1.6. Modéles basis un la distribution de Weibull.       38         2.2.1. Modéles basis un la vitesse d'inactivati	INTRODUCTION		1
L'INACTIVATION NON THERMIQUE BACTERIENNE : ETAT DES LIEUX       3         1.Le stress bactérien       3         1.Le stress acide       3         1.1. Le stress acide us ress acide résistance au stress acide       4         1.2. Le stress osmotique       15         1.2. I e stress osmotique       15         1.2. I plinence de l'activité de l'easistance au stress osmotique       15         1.2. I plinence de l'activité de l'easi va la vitesse d'inactivation       19         1.3. Influence de l'effet protecteur des basses températures       21         1.3. Influence de l'effet protecteur des basses températures       21         1.3. Influence de l'effet protecteur des basses températures       21         1.3. Influence de l'effet protecteur des basses températures       21         1.3. Influence de l'effet protecteur des basses el'inactivation       26         2.1. Modélisation du stress non thermique       26         2.1. Modélisation des courbes de survie       26         2.1. Modéles basés sur l'existence de deux sous populations       33         2.1. Modéles basés sur l'existence de deux sous populations       35         2.2. Modélisation nolulaire       34         2.2. Modélisation nolulaire       37         2.1. Modélisation nolulaire       37         3.2.1. Modéles and revense       <	CHAPITRE 1		
1.Le stress bactérien       3         1.1. Le stress acide       3         1.1. Lo manages et mécanismes de résistance au stress acide       4         1.1. Influence du stress acide sur la vitesse d'inactivation       9         1.2. Le stress osmotique       15         1.2.1. Influence de la température au stress osmotique       15         1.2.2. Influence de la température lors d'un stress       19         1.3. Influence de la température lors d'un stress       21         1.3. Influence de la température sur la vitesse d'inactivation       23         2.Modélisation du stress non thermique       26         2.1. Modélisation des courbes de survie       26         2.1.1. Ac institue d'ordre un : un cas particulier       26         2.1.2. Modélisation des sur la vitesse d'inactivation       33         2.1.3. Matter de l'éque protecteur de deux sous populations       33         2.1.4. Modèle de Geeraerd et al. (2000)       33         2.1.5. Modélisation polynomiale       211         2.1.6. Modélisation polynomiale       38         2.2.1.6. Modélisation polynomiale	L'INACTIVATION NON THERMIQUE BA	CTERIENNE : ETAT DES LIEUX	3
1.1. Le stress acide       3         1.1.1. Domnages et mécanismes de résistance au stress acide       4         1.2. Influence du stress acide sur la vitesse d'inactivation.       9         1.2. Le stress osmotique       15         1.2.1. Domnages et mécanismes de résistance au stress osmotique       15         1.2.1. Domnages et mécanismes de résistance au stress osmotique       15         1.2.1. Domnages et mécanismes de résistance au stress osmotique       15         1.2.1. Influence de la température lors d'un stress       11         1.3. Influence de la température sur la vitesse d'inactivation       21         1.3.1. Nature de l'effet protecteur des basses températures       21         1.3.2. Influence de la température sur la vitesse d'inactivation       23         2.Modélisation du stress non thermique       26         2.1.1. La cinétique d'ordre un : un cas particulier       26         2.1.1. Modéles empiriques d'ainstement       28         2.1.2. Modéles basés sur la distribution de Weibull       31         2.1.4. Modéles basés sur la cistence de deux sous populations.       35         2.2.1. Modélisation polynomiale       38         2.2.2. Modélisation polynomiale       38         2.2.1. Modélisation polynomiale       57         2.2.2. Modélisation modulaire       41         OBJECTI	1.Le stress bactérien		3
12. Le stress osmotique       15         1.2.1 Dommages et mécanismes de résistance au stress osmotique       15         1.2.2. Influence de l'activité de l'eau sur la vitesse d'inactivation       19         13. Influence de la température lors d'un stress       21         1.3.1 Nature de l'effet protecteur des basses températures       21         1.3.2. Influence de la température sur la vitesse d'inactivation       23         2.Modélisation du stress non thermique       26         2.1.1 La cinétique d'ordre un : un cas particulier       26         2.1.1 La cinétique d'ordre un : un cas particulier       26         2.1.1 La cinétique d'ordre un : un cas particulier       28         2.1.3 Modèles basés sur l'existence de deux sous populations       31         2.1.4 Modèle deceraerd et al (2000)       33         2.1.5 Modèles basés sur l'existence de deux sous populations       35         2.2. Modélisation polynomiale       38         2.2.1. Modèles douis aton modulaire       38         2.2.2. Modélisation modulaire       37         1.3.2.1 Modèles douis aton modulaire       37         1.4 ESISTANCE BACTERIENNE       57         1.5 Modèles aton modulaire       38         2.2.2 Modélisation modulaire       38         2.2.1 Modèles aton on wouract Weibull distributions of bacterial resistance for	1.1. Le stress acide         1.1.1. Dommages et mécanismes de ré         1.1.2. Influence du stress acide sur la	sistance au stress acide	3 4 9
1.3.       Influence de la température lors d'un stress.       21         1.3.1       Nature de l'effet protecteur des basses températures.       21         1.3.2       Influence de la température sur la vitesse d'inactivation       23         2.Modélisation du stress non thermique.       26         2.1       Modélisation des courbes de survie       26         2.1.1       La cinétique d'ordre un : un cas particulier.       26         2.1.2       Modéles des courbes de survie       26         2.1.3       Modéles de Geerard et al. (2000).       33         2.1.4       Modéles des sur la distribution de Weibull       31         2.1.5       Modéles deGeerard et al. (2000).       33         2.1.5       Modélisation de l'influence de l'environnement sur la vitesse d'inactivation.       38         2.2.1       Modélisation polynomiale       38         2.2.2       Modélisation modulaire       41         OBJECTIFS ET STRATÉGIE DES TRAVAUX.       55         CHAPITRE 2       MODELISATION PRIMAIRE ET INFLUENCE DES CONDITIONS DE PRECULTURE SUR LA         RESISTANCE BACTERIENNE       57         1.Développement d'un modèle primaire       57         2.2. Materials and methods       63         2.1       Indicivation media and inoculum preparation.       63 </td <td>1.2. Le stress osmotique 1.2.1 Dommages et mécanismes de ré 1.2.2. Influence de l'activité de l'eau s</td> <td>sistance au stress osmotique</td> <td>5 5 9</td>	1.2. Le stress osmotique 1.2.1 Dommages et mécanismes de ré 1.2.2. Influence de l'activité de l'eau s	sistance au stress osmotique	5 5 9
2.Modélisation du stress non thermique       26         2.1       Modélisation des courbes de survie       26         2.1.1       La cinétique d'ordre un : un cas particulier.       26         2.1.2       Modèles empiriques d'ajustement       28         2.1.3       Modèles basés sur la distribution de Weibull.       31         2.1.4       Modèles basés sur l'existence de deux sous populations.       33         2.1.5       Modèlisation de l'influence de l'environnement sur la vitesse d'inactivation.       38         2.2.1       Modèlisation polynomiale       38         2.2.2       Modèlisation modulaire.       41         OBJECTIFS ET STRATÉGIE DES TRAVAUX.       55         CHAPITRE 2       ModElisation modulaire.       57         1.Développement d'un modèle primaire       57         1.Développement d'un modèle primaire       57         2.1       Introduction       63         2.2       Materials and methods       65         2.2.1       Microorganism and inoculum preparation.       65         2.2.1       Introduction       63         2.2       Tested models and numeration of survivors       65         2.2.1       Intercourganism and inoculum preparation.       65         2.2.1       Interco	1.3. Influence de la température lor 1.3.1 Nature de l'effet protecteur des 1.3.2. Influence de la température sur	s d'un stress	1 1 3
2.1       Modélisation des courbes de survie       26         2.1.1.       La cinétique d'ordre un : un cas particulier.       26         2.1.2.       Modèles empiriques d'ajustement       28         2.1.3.       Modèles basés sur l'aistribution de Weibull.       31         2.1.4.       Modèle de Geeraerd et al. (2000).       33         2.1.5.       Modèles basés sur l'existence de deux sous populations.       35         2.2.       Modèlisation de l'influence de l'environnement sur la vitesse d'inactivation.       38         2.2.1.       Modèlisation modulaire.       41         OBJECTIFS ET STRATÉGIE DES TRAVAUX.       55         CHAPITRE 2       ModELISATION PRIMAIRE ET INFLUENCE DES CONDITIONS DE PRECULTURE SUR LA         RESISTANCE BACTERIENNE       57         1.Développement d'un modèle primaire       57         2.1       Introduction       63         2.1       Introduction       63         2.2.       Materials and methods       65         2.2.1       Microorganism and inoculum preparation.       65         2.2.1       Interoduction media and numeration of survivors       65         2.2.1       Interodues       65         2.2.2       Parameter estimation, confidence intervals and model evaluation       67 <td>2. Modélisation du stress non thermic</td> <td>Jue20</td> <td>6</td>	2. Modélisation du stress non thermic	Jue20	6
2.2. Modélisation de l'influence de l'environnement sur la vitesse d'inactivation       38         2.2.1. Modélisation polynomiale       38         2.2.2. Modélisation modulaire       41         OBJECTIFS ET STRATÉGIE DES TRAVAUX	<ul> <li>2.1 Modélisation des courbes de su</li> <li>2.1.1. La cinétique d'ordre un : un cas</li> <li>2.1.2. Modèles empiriques d'ajusteme</li> <li>2.1.3. Modèles basés sur la distributio</li> <li>2.1.4. Modèle de Geeraerd et al. (200)</li> <li>2.1.5. Modèles basés sur l'existence d</li> </ul>	urvie       20         s particulier       2         nt       2         m de Weibull       3         0)       3         e deux sous populations       3	6 6 8 1 3 5
OBJECTIFS ET STRATÉGIE DES TRAVAUX	2.2. Modélisation de l'influence de 2.2.1. Modélisation polynomiale 2.2.2. Modélisation modulaire	l'environnement sur la vitesse d'inactivation	8 8 1
CHAPITRE 2         MODELISATION PRIMAIRE ET INFLUENCE DES CONDITIONS DE PRECULTURE SUR LA         RESISTANCE BACTERIENNE       57         1.Développement d'un modèle primaire       57         2.A general model based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance for fitting various shapes of inactivation curves       63         2.1       Introduction       63         2.2.       Materials and methods       65         2.2.1       Inactivation media and numeration of survivors       65         2.2.1       Inactivation media and numeration of survivors       65         2.2.3       Parameter estimation, confidence intervals and model evaluation       67         2.3       Results       68         2.3.1       Influence of the physiological state of cells on the pattern of survival curves       68         2.3.2       Quality of fit       68         2.3.3       Effect of the physiological state on the estimated parameters of models       68         2.4       Discussion       75	<b>Objectifs et Stratégie des trava</b>	UX5	5
1.Développement d'un modèle primaire       57         2.A general model based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance for fitting various shapes of inactivation curves       63         2.1 Introduction       63         2.2. Materials and methods       65         2.1. Introduction media and inoculum preparation       65         2.2. Tested models       65         2.2. Tested models       65         2.3. Parameter estimation, confidence intervals and model evaluation       67         2.3. Results       68         2.3.1 Influence of the physiological state of cells on the pattern of survival curves       68         2.3.2 Quality of fit       68         2.4 Discussion       75	CHAPITRE 2 Modelisation primaire et influ resistance bacterienne	UENCE DES CONDITIONS DE PRECULTURE SUR La	A 7
2.A general model based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance for         fitting various shapes of inactivation curves       63         2.1 Introduction       63         2.2. Materials and methods       65         2.2.1 Microorganism and inoculum preparation       65         2.2.1 Inactivation media and numeration of survivors       65         2.2.2 Tested models       65         2.2.3 Parameter estimation, confidence intervals and model evaluation       67         2.3 Results       68         2.3.1 Influence of the physiological state of cells on the pattern of survival curves       68         2.3.2 Quality of fit       68         2.3.3 Effect of the physiological state on the estimated parameters of models       68         2.4 Discussion       75	1.Développement d'un modèle prima	ire5٬	7
2.1       Introduction	2.A general model based on two mix fitting various shapes of inactivation	ted Weibull distributions of bacterial resistance fo curves	r 3
2.2. Materials and methods       65         2.2.1 Microorganism and inoculum preparation       65         2.2.1 Inactivation media and numeration of survivors       65         2.2.2 Tested models       65         2.2.3 Parameter estimation, confidence intervals and model evaluation       67         2.3 Results       68         2.3.1 Influence of the physiological state of cells on the pattern of survival curves       68         2.3.2 Quality of fit       68         2.3.3 Effect of the physiological state on the estimated parameters of models       68         2.4 Discussion       75	2.1 Introduction		3
2.3. Results       68         2.3.1. Influence of the physiological state of cells on the pattern of survival curves       68         2.3.2. Quality of fit       68         2.3.3. Effect of the physiological state on the estimated parameters of models       68         2.4 Discussion       75	2.2. Materials and methods	65 reparation	5 5 5 7
	<ul> <li>2.3. Results</li> <li>2.3.1. Influence of the physiological state</li> <li>2.3.2. Quality of fit</li> <li>2.3.3. Effect of the physiological state</li> <li>2.4. Discussion</li> </ul>	ate of cells on the pattern of survival curves	8 8 8 8 5

## CHAPITRE 3

MODELISATION SECONDAIRE	81
1.Développement de modèles secondaires	81
2.Modelling the non thermal inactivation of <i>Listeria monocytogenes</i> or <i>typhimurium</i> as a function of environmental factors: pH, lactic acid co sodium chloride concentration and temperature	<i>Salmonella</i> oncentration, 85
2.1 Introduction	
<ul> <li>2.2 Materials and methods</li></ul>	86 86 87 87 87 87 89 90
2.3.1 Behaviour of parameters α and p	
<ul> <li>2.3.2 Influence of pH on bacterial resistance</li> <li>2.3.3 Influence of acid lactic concentration on bacterial resistance</li> </ul>	
2.3.4 Influence of sodium chloride concentration on bacterial resistance	
2.3.5 Influence of temperature on bacterial resistance	
2.4 Discussion	
CHAPITRE 4	
MODELISATION TERTIAIRE	111
1.Validation de la modélisation au sein d'aliments	111
2.Validation of a modular approach for the non-thermal inactivation a <i>Listeria monocytogenes</i> and <i>Salmonella typhimurium</i> in food products	nodelling of 113
2.1. Introduction	113
2.2. Materials and methods	
<ul><li>2.2.3. Primary and secondary model</li><li>2.2.4. Prediction of bacterial survival in food and its evaluation</li></ul>	116 117
<ul> <li>2.3. Results</li></ul>	
2.4. 1. Discussion	
DISCUSSION GENERALE	

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	35
----------------------------	----

# LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

## CHAPITRE 1 L'INACTIVATION NON THERMIQUE BACTERIENNE : ETAT DES LIEUX

#### 1. Le stress bactérien

Tableau 1 Classement des acides selon leur efficacité bactéricide.	
Tableau 2 Valeur de l'activité de l'eau à partir de laquelle la sensibilité des m	nicroorganismes
vis-à-vis de l'addition de dépresseur change	
Tableau 3 Influence de la température sur la vitesse d'inactivation	

Figure 1 Représentation schématique des systèmes liés à la résistance et à l'adaptation au stress acide de <i>Listeria monocytogenes</i>
Figure 2 Représentation schématique des systèmes dans le texte au stress acide de <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>
Figure 3 Influence du pH sur le temps nécessaire à 4 réductions décimales de <i>Listeria</i> monocytogenes et Salmonella typhimurium
Figure 4 Evolution de la forme des courbes de survie en fonction de l'intensité du stress acide
Figure 5 Courbes de survie de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Salmonella typhimurium</i> soumis à un stress acide
Figure 6 Nombre de réductions décimales pour 30 souches de <i>Listeria monocytogenes</i> et de <i>Salmonella typhimurium</i> suite à stress acide
Figure 7 Représentation schématique des systèmes liés à la résistance et à l'adaptation au stress osmotique de <i>Listeria monocytogenes</i> et de <i>Salmonella typhimurium</i>
Figure 8 Influence de l'activité de l'eau de chorizo sur la durée nécessaire à la première réduction décimale de <i>Salmonella spp.</i> incubées à 6°C, 25°C et 30°C 20
Figure 9 Effet de la température sur le nombre de réduction décimale engendré par un stress acide en tampon citrate sur des cellules de <i>Salmonella typhimurium</i> en phase stationnaire de croissance, ou en phase exponentielle
Figure 10 Influence de la température sur la durée nécessaire à la première réduction décimale de <i>Listeria monocytogenes</i> CA et V7 pour un stress acide

#### 2. Modélisation du stress non thermique

Tableau 1 Exemples de modèles secondaires polynomiaux utilisés pour l'inactivation	non
thermique	. 40
Tableau 2 Exemples de modèles secondaires utilisés pour l'inactivation non thermique	. 42
· · · ·	
Eisure 1 Différentes formes de courbes d'insetiution	27

Figure 1 Differentes formes de courbes d'inactivation	
Figure 2 Allures des courbes de survie décrites par le modèle étendu de Buchanan	30
Figure 3 Allures des courbes de survie décrites par le modèle de Weibull et par s	a forme
modifiée	32
Figure 4 Allures des courbes de survie décrite pas le modèle de Geeraerd et al.	34
Figure 5 Allures des courbes de survie décrites par le modèle Xiong et al.	36
Figure 6 Allures des courbes de survie décrites par le modèle de Whiting	37

#### CHAPITRE 2 MODELISATION PRIMAIRE ET INFLUENCE DES CONDITIONS DE PRECULTURE SUR LA RESISTANCE BACTERIENNE

#### 1. Développement d'un modèle primaire

Figure 1	Diagramme du modèle de survie suivant une double distribution de V	Weibull	de la
	résistance au stress.		59
Figure 2	Représentation de l'évolution de la forme des cinétiques de survie en f	onction	de la
	valeur de $\alpha$		60

# 2. A general model based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance for fitting various shapes of inactivation curves

 Table 1 Minimum C(θ) and AIC criterions for the different survival curves of Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes
 70

Figure 1 Evolution of the population size, of optical density and pH during growth precedin	ıg
the inactivation of <i>L. monocytogenes</i> and <i>S. enterica</i> serovar Typhimurium6	58
Figure 2 Evolution of the shape of survival curves of S. enterica serovar Typhimurium ar	ıd
fitted curves of the models	71
Figure 3 Evolution of the shape of survival curves of L. monocytogenes and fitted curves	of
the models	72
Figure 4 Evolution of the estimated parameters versus the time of incubation of subculture for	or
S. enterica serovar Typhimurium	73
Figure 5 Evolution of the estimated parameters versus the time of incubation of subculture f	or
L. monocytogenes	74
Figure 6 Diagram of survival model based on the double Weibull distribution of th	he
resistance	76
Figure 7 Different shape of inactivation curves	77

#### CHAPITRE 3 MODÉLISATION SECONDAIRE

2. Modelling the non thermal inactivation of Listeria monocytogenes or Salmonella typhimurium as a function of environmental factors: pH, lactic acid concentration, sodium chloride concentration and temperature

Table 1 Estimates of parameters of the pH model for Listeria monocytogenes and Salmonella
typhimurium
Table 2 Estimates of parameters of the acid model for Listeria monocytogenes and Salmonella
typhimurium
Table 3 Estimates of parameters of the NaCl model for <i>Listeria monocytogenes</i>
Table 4 Estimates of parameters of the NaCl model for Salmonella typhimurium
Table 5 Estimates of parameters of the temperature model
Table 6 Estimates of parameters of the global model for <i>Listeria monocytogenes</i> 103
Table 7 Estimates of parameters of the global model for Salmonella typhimurium
Figure 1 Experimental design to study the influence of pH, undissociated lactic acid concentration and sodium chloride concentration on the inactivation of <i>Salmonella typhimurium</i>
Figure 2 Diagram of survival model based on the double Weibull distribution of the resistance

#### CHAPITRE 4 MODÉLISATION TERTIAIRE

# 2. Validation of a modular approach for the non-thermal inactivation modelling of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in food products

Table 1 Physicochemical properties of food products and storage temperature for challenge
tests
Table 2 Estimated parameters of the primary model fitted on challenge test kinetics for
Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium
Table 3 Estimated parameters of the global secondary model and the 2.5% and 97.5%
quartiles of the bootstrapped estimated parameters for <i>Listeria monocytogenes</i> 121
Table 4 Estimated parameters of the global secondary model and the 2.5% and 97.5%
quartiles of the bootstrapped estimated parameters for Salmonella typhimurium122
Table 5 Accuracy factors and percent discrepancy for Listeria monocytogenes and Salmonella
<i>typhimurium</i> survival in food product
Table 6 Bias factors and percent bias for Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium
survival in food product
*

Figure	1	Calibration kinetics in food products for Listeria monocytogenes and Salmonella
		typhimurium
Figure	2	Confrontation between challenge test in food product and prediction of Listeria
		monocytogenes survival
Figure 3	3	Confrontation between challenge test in food product and prediction of Salmonella
		typhimurium survival

### CONCLUSION

Tableau 1 Paramètres du modèle global caractéristiques de la résistance	bactérienne au sein de
différente matrice et de la sensibilité bactérienne	

Figure 1 Fo	onction de d	densité de	probabilité	la résistance	bactérienne	au stress	décrite pa	ar un
d	ouble modè	èle de Wei	bull					. 137

# Introduction

Des bactéries pathogènes peuvent apparaître sporadiquement dans les aliments. L'origine de leur apparition est due à l'utilisation de matières premières crues ou contaminées, et à la contamination durant l'élaboration du produit ou durant son stockage. L'efficacité des techniques utilisées durant la fabrication et le stockage pour maîtriser le risque microbiologique est profondément liée aux propriétés physico-chimiques du produit alimentaire, ainsi qu'à la nature et à l'état physiologique de la flore microbienne d'intérêt et de l'agent infectieux présents. L'évolution des techniques d'élevage, des conditions de fabrication et de la consommation, a fait émerger de nouvelles toxi-infections alimentaires. L'appréciation quantitative des risques permet de pondérer chacun de ces dangers en termes de fréquence, ou de probabilité d'apparition et de gravité. Cette démarche comporte 4 étapes : l'identification du danger, l'appréciation des effets, l'appréciation de l'exposition et l'estimation des risques (Codex Alimentarius, *1995)*. Vis-à-vis d'un risque microbiologique, elle consiste à modéliser la transmission et l'évolution de bactéries pathogènes « *de la fourche à la fourchette* ».

La Microbiologie prévisionnelle permet de prédire si, et à quelle vitesse, les pathogènes vont se multiplier, survivre ou mourir en fonction du procédé, de la formulation de l'aliment et des conditions de stockage. Il s'agit donc d'un outil précieux pour une appréciation quantitative des risques permettant de prédire le niveau de contamination aux différentes étapes des procédés de fabrication, de distribution, et de stockage chez le consommateur. En plus de son utilisation en analyse quantitative des risques, la Microbiologie prévisionnelle peut servir à optimiser un procédé de fabrication, une formulation d'aliment et à calculer approximativement les dates limites de consommation vis-à-vis d'un risque microbiologique potentiel. Elle peut être appliquée aussi aux flores d'altération ou d'intérêt afin de mieux maîtriser leur développement. La Microbiologie prévisionnelle consiste à développer des modèles mathématiques permettant de quantifier le comportement dynamique de populations bactériennes en fonction des conditions physico-chimiques de l'environnement, de leurs variations et de l'état physiologique des microorganismes considérés.

Avec le renforcement de la sécurité des aliments, le développement de modèles décrivant l'évolution des microorganismes a connu un grand essor durant les dernières décennies. La Microbiologie prévisionnelle est apparue dès le début du vingtième siècle avec notamment la quantification de l'impact des traitements thermiques sur les populations bactériennes indésirables. Les modèles développés alors sont toujours d'actualité comme par exemple le modèle de Bigelow permettant d'évaluer la résistance des microorganismes en fonction de la température de traitement (Bigelow, 1921). La diversité actuelle des produits alimentaires, et la diminution de l'intensité des traitements leur étant appliqués pour préserver leurs qualités organoleptiques et nutritionnelles, ont été accompagnées par le développement de modèles permettant de décrire la croissance et l'inactivation thermique. Par exemple en ce qui concerne cette dernière, des modèles permettent de prendre en compte l'influence de l'acidité, de sa teneur en sel aussi bien au niveau du traitement thermique, qu'au niveau de la capacité de revivification des microorganismes après le traitement. Concernant le développement bactérien de multiples facteurs environnementaux sont pris en compte dans différents modèles allant de la température aux additifs alimentaires en passant par la composition en gaz de l'atmosphère de stockage de l'aliment.

Toutefois, il reste de nombreux points non maîtrisés pour permettre la prédiction de manière relativement précise de l'évolution d'un effectif bactérien durant l'élaboration et le stockage d'un aliment. Le lent déclin d'une population au cours de sa conservation, durant un

stress acide ou osmotique ne peut pas être prédit actuellement de façon fiable. Pourtant étant donné le faible niveau de contamination rencontré dans les produits, une telle prédiction pourrait être fort utile pour assurer l'innocuité d'un aliment. L'utilisation d'additifs alimentaires contribue à assurer la stabilité à la conservation. Certains comme le chlorure de sodium ou les acides sont utilisés depuis des millénaires. Afin de pouvoir décrire l'impact de l'ensemble des formulations et des procédés utilisés par l'industrie agroalimentaire sur l'évolution de populations bactériennes, il est donc nécessaire de compléter la connaissance de la croissance et de l'inactivation thermique par celui de l'inactivation non thermique. L'objectif de ce travail est de proposer une démarche modélisatrice fiable, robuste et souple, qui puisse être par la suite facilement complétée par la prise en compte de nouveaux facteurs. Les stress bactériens retenus dans cette étude sont les stress provoqués par les facteurs physico-chimiques les plus communément rencontrés au niveau des denrées : le stress acide et le stress osmotique. Nous avons également retenu la température dans un domaine correspondant aux températures de stockage éventuellement rencontrées lors de la distribution ou du stockage chez le consommateur.

Le travail présenté dans ce rapport s'articule en quatre parties :

- Le premier chapitre est consacré à un état des lieux de l'impact des stress les plus communs, le stress acide ou osmotique modulé par différentes températures d'incubation ou de stockage. Pour chaque facteur, nous présenterons le stress d'un point de vue physiologique avec les mécanismes bactériens de résistance et d'un point de vue qualitatif, à savoir quel est l'impact des variations de ces facteurs sur la résistance bactérienne. Les différents modèles et méthodes utilisés pour décrire l'inactivation non thermique seront également présentés.
- Après avoir ciblé précisément les objectifs de ces travaux, nous présenterons un nouveau modèle primaire permettant de décrire les courbes de survie bactériennes et donc de caractériser la résistance d'une population bactérienne. Cette présentation est illustrée par des courbes de survie obtenues pour un même stress mais pour des états physiologiques différents des populations en milieu synthétique.
- Dans le troisième chapitre, des modèles secondaires seront proposés pour décrire l'évolution de la résistance bactérienne en fonction de l'intensité du stress obtenu en bouillon de culture modifié vis-à-vis du pH, concentration en chlorure de sodium et à différentes températures d'incubation.
- Le dernier chapitre sera consacré à la validation du système de modèles proposé sur aliments et à ses perspectives d'applications.

## Références

- Codex Alimentarius Commission, Food Standards Program Codex Alimentarius Commission. 1995. Report of the 28th Session of the Codex Committee on Food Hygiene. Washington DC, 27 November-1 December. ALINORM 97/13.
- **Bigelow, W. D. 1921.** The logarithmic nature of thermal death curves. Journal of Infectious Diseases 29: 528-539.

# L'inactivation non thermique bactérienne : Etat des lieux

# 1. Le stress bactérien

Les organismes vivants sont dépendants de leur environnement par le biais d'échanges de matières et d'énergie nécessaires à leur survie. Si les conditions environnementales sont compatibles avec la vie, un équilibre s'installe entre les organismes et le système dans lequel ils vivent. Dans la plupart des cas, cet équilibre est précaire, perturbé par des variations spatiales ou temporelles des conditions physiques, chimiques et biologiques de l'environnement. La survie des organismes est alors liée à leur capacité à composer avec ces variations et de maintenir leurs conditions internes à un niveau compatible avec la vie. Cette capacité à maintenir les conditions intracellulaires, pour les microorganismes, à un niveau constant est appelée homéostasie.

En Microbiologie, les variations des conditions environnementales défavorables aux microorganismes sont appelées stress. Elles peuvent être de nature physique (température, pression, radiation), chimique (additions acides/bases, sels), ou biologique (compétitions avec d'autres organismes, antagonisme). Ces modifications de l'environnement bactérien, induisent des changements des conditions cellulaires. Le retour des conditions à un niveau permettant la survie peut se décomposer en trois étapes :

- La perception du signal, par exemple par le changement de configuration spatiale ou l'altération de protéines, le changement de la fluidité membranaire ou de la pression de turgescence.
- La réponse bactérienne au stress, qui peut consister à réparer les dommages subis, à produire des éléments résistants aux nouvelles conditions ou permettant une résistance accrue des systèmes en place, à transformer la cellule (sporulation).
- Le résultat de la réponse, qui peut être l'adaptation du microorganisme à son nouvel environnement, ou sa mort.

Dans un milieu aux conditions viables, un microorganisme est donc en équilibre avec le système qui l'entoure. La survie de l'organisme va dépendre de l'état physiologique de la cellule bactérienne, lui permettant d'assurer ses fonctions vitales dans des conditions données. Si cet équilibre est rompu par une variation des conditions environnementales, la bactérie va tout d'abord utiliser les mécanismes qui lui sont immédiatement disponibles pour lutter contre le stress. Puis, dans le meilleur des cas, elle va s'adapter en développant différents systèmes de résistance lui permettant de survivre aux nouvelles conditions. Dans le cadre de cette étude, le stress acide et le stress osmotique ont été retenus puisqu'il s'agit des facteurs environnementaux les plus exploités dans les procédés de conservation des aliments. Le rôle de la température est également étudié mais dans une gamme restreinte. Contrairement au cas des deux stress précédents, une gamme non létale de température positive a été retenue.

# 1.1. Le stress acide

Dans l'environnement, les bactéries sont soumises à des variations de pH importantes. Un fromage par exemple peut voir son pH évoluer de plus de 3 unités au cours de son affinage. Le pH rendant compte de la concentration en protons ( $H^+$ ), un changement d'une unité représente une variation par un facteur 10 de la quantité en ions hydronium ( $H_3O^+$ ) ou hydroxyde (OH<sup>-</sup>). Ainsi une modification du milieu d'une, deux ou trois unités pH entraîne

une variation de 10, 100 au 1000 de la concentration en protons. Pour des espèces neutrophiles comme *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*, un bouleversement de l'acidité de leur environnement entraîne des dommages cellulaires importants et de lourdes dépenses énergétiques pour maintenir le pH intracellulaire (pH<sub>int</sub>) à une valeur compatible avec la vie. *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* essaient de maintenir leur pH intracellulaire (pH<sub>int</sub>) proche de la neutralité (Audia *et al.*, 2001; Shabala *et al.*, 2002). Dans ces conditions d'acidité optimale pour la croissance, le pH<sub>int</sub> est proche de 7,5. Si le milieu est acide, le pH<sub>int</sub> est toujours supérieur d'au moins une demi unité par rapport au pH de l'environnement de la bactérie, permettant le maintien de la force protomotrice (Hickey et Hirshfield, 1990; 1991; Foster, 1993; O'Driscoll *et al.*, 1997; Barker et Park, 2001; Shabala *et al.*, 2002).

Dans les tous premiers temps d'exposition à un environnement de pH acide, les protons entrent massivement dans la cellule bactérienne. Puis très rapidement, en moins de deux minutes, le flux net de protons diminue sous l'action des mécanismes d'exportation (Shabala *et al.*, 2002). Le flux net se stabilise en moins de 5 minutes. Le pH<sub>int</sub> est dépendant du flux de protons, il est donc rapidement stabilisé à un pH supérieur au pH extérieur. Chez *Listeria monocytogenes*, le pH<sub>int</sub> varie de 5,5 à 7,8 dans des cellules en suspension dans du bouillon tryptone soja de pH allant de 3,0 à 7,0 (O'Driscoll *et al.*, 1997) ou de 5,0 à 7,8 pour un pH externe de 3,0 à 6,0 en milieu minimum (Shabala *et al.*, 2002). Chez *Salmonella typhimurium*, le pH<sub>int</sub> varie de 7,0 à 7,6 en milieu minimum dont le pH est de 5,0 à 7,0 (Hickey et Hirshfield, 1990), de 5,7 à 7,9 pour un pH externe de 4,0 à 7,5 en bouillon minimum glucose (Foster et Hall, 1991; Foster, 1993). Le maintien du pH<sub>int</sub> à un niveau compatible avec le maintien des fonctions vitales pour la bactérie est régi par un ensemble complexe de mécanismes.

# 1.1.1. Dommages et mécanismes de résistance au stress acide

### Dommages et altérations dus au stress acide

L'acidification d'un milieu peut se faire par la modification de sa composition en acides organiques ou inorganiques. Des différences de résistance ont été observées en fonction de la nature de l'acide. Si la paroi bactérienne empêche la diffusion libre des protons, elle reste perméable aux acides faibles sous leur forme non dissociée (AH). Ceux-ci vont se dissocier dans le cytoplasme en fonction de leur pKa, et provoquer une chute du pH<sub>int</sub> par la libération des protons, une augmentation de la turgescence cellulaire et une inhibition des voies métaboliques par l'accumulation de la forme anionique (A<sup>-</sup>) interagissant avec les protéines (Ita et Hutkins, 1991; Bearson *et al.*, 1997; Cotter et Hill, 2003).

Les premières structures touchées par l'acidification du pH extracellulaire sont évidemment les macromolécules situées à la surface bactérienne (flagelle, pili, récepteur chimique, protéines périplasmiques, paroi ...). Les microorganismes ont peu de possibilités de protéger ces structures : soit ils sont capables de produire une version modifiée de la structure résistante à l'acide, soit ils se passent de la fonction (perte de mobilité suite à un stress) ou la modulent (utilisation de voie métabolique alternative) (Metzner *et al.*, 2004a).

Ainsi lors d'une acidification, les protons vont entrer dans la cellule par le changement de gradient de concentration autour de la paroi bactérienne (Dilworth et Glenn, 1999). La baisse du pH intracellulaire ( $pH_{int}$ ) provoquée par cet afflux de protons entraîne des perturbations de flux métabolique et des dommages aux macromolécules (Foster, 1999). Une baisse du pH<sub>int</sub> va favoriser l'oxydation des lipides, et modifier l'état d'ionisation des lipides modifiant leurs propriétés d'interaction avec les autres constituants cellulaires. Le même phénomène est observé pour les protéines, pour lesquelles une baisse de pH va entrainer une

augmentation des charges positives. La modification de leur état d'ionisation va modifier leur configuration spatiale et altérer leur fonctionnalité. Cette modification du métabolisme va également perturber la transcription des gènes. Au bas pH, l'ADN lui-même est fragmenté, par altération des bases puriques et pyrimidiques (Cotter et Hill, 2003).

### Mécanismes de résistance et adaptation au stress acide

L'exposition de cellules en phase exponentielle de croissance de Salmonella typhimurium à un pH modérément acide avant un stress, va lui conférer une résistance bien supérieure à celle observée quand le stress est appliqué directement (Foster et Hall, 1990). De même, les cellules en phase stationnaire de croissance sont plus résistantes que ces cellules en phase exponentielle (Lee et al., 1994). La réponse des bactéries au stress est donc une réponse adaptative. Elle est fonction de l'état physiologique initiale dans lequel la cellule se trouve, de l'intensité et de la nature du stress subi. Des protéines de stress sont produites lorsqu'une bactérie est soumise à des conditions défavorables. Les moyens mis en œuvre doivent être aussi diversifiés que les stress potentiellement rencontrés pour permettre la survie du microorganisme. Ainsi, chez Salmonella typhimurium seulement 5 protéines sont communes entre une adaptation en phase exponentielle (60 protéines de stress exprimées) et une adaptation au stress en phase stationnaire (48 protéines de stress exprimées) (Audia et al., 2001). Le rôle de ces protéines est de prévenir et de réparer les dommages subis par les macromolécules. Les protéines de stress peuvent permettre la régulation de l'expression des gènes de résistance comme les facteurs de transcriptions  $\sigma^B$  chez les bactéries gram positif ou  $\sigma^{S}$  pour les entérobactéries ou être directement impliquées dans la résistance au stress acide comme la glutamate décarboxylase (GAD). L'ensemble des mécanismes de résistance au stress est complexe et fait intervenir de multiples acteurs à différents niveaux de la machinerie cellulaire. Nous évoquerons les principaux acteurs des mécanismes de résistance.

#### La régulation de la réponse au stress acide

#### Les facteur $\sigma$

L'ARN polymérase est composée de sous-unités permettant la polymérisation de l'ARN à partir de l'ADN, et d'une sous-unité  $\sigma$  permettant sa fixation à l'ADN. Différents types de sous unité  $\sigma$  existent. Interagissant avec les facteurs de transcription, ils permettent une reconnaissance spécifique des gènes. Les différentes sous-unités  $\sigma$  sont impliquées dans le contrôle des gènes liés par exemple à la croissance, au « housekeeping », à la synthèse flagellaire, aux réponses vis-à-vis du stress acide, osmotique ou thermique (Abee et Wouters, 1999; Ishihama, 2000).

Concernant le stress, les facteurs  $\sigma^{B}$  pour *Listeria monocytogenes* ou  $\sigma^{S}$  pour *Salmonella typhimurium* sont les régulateurs majeurs de la réponse adaptative, et plus particulièrement du stress acide.  $\sigma^{B}$  et  $\sigma^{S}$  interviennent au centre de cascades d'intégration de signaux extracellulaires et sont associés de façon générale avec la réponse des cellules induite par différents stress. Codés par le gène *RpoS*, les facteurs  $\sigma^{B}$  et  $\sigma^{S}$  permettent l'activation d'un grand nombre de gènes (Abee et Wouters, 1999; Dodd et Aldsworth, 2002; Kazmierczak *et al.*, 2003; Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2004).  $\sigma^{B}$  est très fortement exprimé en fin de phase stationnaire et joue un rôle prédominant pour l'adaptation à ce stade de croissance. Des mutants  $\sigma^{B}$  de *Listeria monocytogenes* sont 10000 fois plus sensibles à un stress acide que les cellules natives. Mais une fois adaptés ces mutants deviennent 10 fois plus résistants que les mutants non adaptés, ce qui met en évidence des réponses adaptatives dépendantes et indépendantes du facteur  $\sigma^{B}$  (Abee et Wouters, 1999).

En réponse à ces stimuli, l'expression de rpoS est modulée au niveau transcriptionnel, au niveau traductionnel ou au niveau de la stabilité de la protéine. Mais l'essentiel du contrôle

de l'expression de rpoS repose sur des mécanismes de contrôle au niveau posttranscriptionnel par, entre autres, deux facteurs protéiques Hfq et de H-NS (Kolb, 2001).

#### Les systèmes de transduction du signal

Les cellules bactériennes possèdent de nombreux capteurs internes, externes et mixtes, leur permettant de percevoir les variations des conditions externes et internes et de synchroniser la réponse transcriptionnelle Martinez-Antonio *et al.*, 2006. Etant données les grandes différences physiologiques entre *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* les systèmes de transduction du signal sont fort différents. Cependant, les systèmes LisRK et PhoPQ peuvent être rapprochés. Typique de *Listeria monocytogenes*, le premier met en œuvre une sonde membranaire de type « histidine kinase », LisK, et un régulateur de réponse cytoplasmique, LisR (Hill *et al.*, 2002). Le second est constitué de PhoQ et de PhoP. PhoQ permet de détecter les ions Mg<sup>2+</sup> et de Ca<sup>2+</sup> en faible concentration et phosphoryle PhoP. Des travaux ont mis évidence l'induction du système PhoPQ en milieu modérément acide et riche en ion magnésium. Il semblerait que les protons changent la conformation du site de liaison vis-à-vis du magnésium et permettent ainsi la phosphorylation de PhoP (Bearson *et al.*, 1998). Une fois activé, LisR et PhoP vont induire la synthèse de protéines de stress (figure 1). Par exemple le système PhoPQ, dont la production est induite sous condition de stress acide, régule positivement en général, plus de 40 protéines (Rychlik et Barrow, 2005).

Pour Salmonella typhimurium, d'autres systèmes de perception du signal permettent une réponse adaptative au stress comme Fur et OmpR-EnvZ (figure 2). En plus de son rôle dans l'assimilation du fer, la protéine Fur est également un régulateur positif pour l'expression de nombreuses protéines de stress (Foster, 1999; Audia *et al.*, 2001, Rychlik, 2005 #265). Concernant le système à deux composantes OmpR-EnvZ, la protéine OmpR est elle-même une protéine de stress (Bang *et al.*, 2000). La kinase membranaire EnvZ est capable de s'autophosphoryler et de transférer le phosphate à OmpR. OmpRP est alors capable de se lier à l'ADN pour réguler de nombreux gènes et notamment des gènes codant pour des protéines de stress acide. Mais OmpR peut être également phosphorylé à bas pH en présence d'acétylphosphate (Rychlik et Barrow, 2005).

#### Mécanismes de résistance directement impliqués dans l'homéostasie du pH

Une baisse du pH<sub>int</sub> peut être régulée par la circulation de K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> via les antiports ou les pompes à protons (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase) (Cotter et Hill, 2003). Le complexe F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase assure la production d'ATP en utilisant la force proton-motrice produite par la respiration cellulaire. En aérobiose, il permet de générer la force proton-motrice en expulsant les protons dans le domaine extracellulaire et en utilisant l'ATP produit par les voies fermentatives. Le complexe membranaire F<sub>0</sub> forme un canal à protons avec ces sous-unités a, b et c. Le composé périphérique F<sub>1</sub> (sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) est responsable de l'activité ATPase, il synthétise ou hydrolyse de l'ATP selon que les protons entrent ou sortent dans la cellule.

Depuis longtemps mis en évidence chez les bactéries à gram négatif, et plus récemment chez les autres, le rôle de la  $F_0F_1$ -ATPase est majeur pour la réponse adaptative au stress acide (Richard et Foster, 2004). La  $F_0F_1$ -ATPase est plus impliquée dans la résistance en phase stationnaire. En présence d'inhibiteur de l'activité ATPase (DCCD), les cellules sont plus sensibles que les cellules non traitées. Et parmi les cellules traitées il reste 1% de survivants à partir de la phase stationnaire et 0,001% des survivants à partir de la phase stationnaire et 0,001% des survivants à partir de la phase stationnaire et 0,001% des survivants à partir de la phase exponentielle par rapport aux cellules non traitées (Datta et Benjamin, 1997). D'autre part, la production des sous-unités est augmentée en cas d'une baisse brutale du pH (Cotter et Hill, 2003). En utilisant la méthode des microarrays qui permet d'étudier l'expression des gènes (Maurer *et al.*, 2005), il apparaît que l'expression des gènes liés à la synthèse de  $F_0F_1$ -ATPase est augmentée dans le cadre d'un stress basique (pH=8,7). Par contre, elle n'apparaît pas

significativement augmentée pour le cas d'un stress acide (pH=5,0). La  $F_0F_1$ -ATPase serait impliquée dans une réponse adaptative au stress basique permettant l'importation de protons, plutôt qu'à leur exportation coûteuse en énergie en cas de stress acide.

D'autres solutions peuvent être mises en place pour favoriser un retour du pH<sub>int</sub> à une valeur normale. Lors d'un stress acide, la membrane change de composition pour mieux résister au stress. Les acides mono-insaturés et de chaînes plus longues sont préférés (Booth, 1999). Des molécules peuvent être produites afin de renforcer le pouvoir tampon du cytoplasme, comme le citrate et l'iso-citrate par *Salmonella typhimurium* (Hall *et al.*, 1995). Le rôle des protéines chaperonnes est également important pour la résistance au stress acide. Elles participent à la configuration spatiale des protéines, mais aussi à leur renaturation et à leur protection. Elles permettent également d'évacuer les protéines endommagées (Bearson *et al.*, 1997). Pour lutter contre le phénomène de dégradation de l'ADN, les bactéries vont augmenter la production des enzymes ou des systèmes de réparations comme les endonucléases, et de protection, comme les méthyltransférases (Cotter et Hill, 2003)

Si dans le cas d'un stress alcalin le catabolisme des sucres peut aider à abaisser le pHint, dans le cas d'un stress acide la décarboxylation des acides aminés permet de diminuer la concentration intracellulaire en protons. La production de glutamate ou le catabolisme du  $\gamma$ aminobutyrate sont des acteurs majeurs de la réponse adaptative au stress acide (Metzner et al., 2004b). A une moindre échelle, la lysine est convertie en cadavérine dans le cadre d'un stress acide. L'ammoniaque, l'urée et l'arginine jouent également un rôle dans l'alcalinisation du milieu interne. L'ammoniaque est convertie en ion ammonium, l'urée libère du dioxyde de carbone et de l'ammonium. Quant à la décarboxylation de l'arginine, elle produit selon l'enzyme de l'agmatine ou de l'ornithine, des ions ammonium et du dioxyde de carbone. Les produits finaux des décarboxylations sont ensuite échangés contre un nouveau substrat par le jeu d'antiports transmembranaires (Bearson et al., 1997; Richard et Foster, 2004). La présence de décarboxylases permet non seulement de faire remonter le pH<sub>int</sub> par utilisation des protons, mais aussi de faire légèrement remonter le pH extracellulaire par l'exportation des produits finaux des réactions enzymatiques. La décarboxylation des acides aminés est importante dans la résistance au stress acide. Pour Salmonella typhimurium, l'utilisation de la lysine permet de maintenir une différence d'une unité entre le pH extracellulaire et le pH intracellulaire (Bearson et al., 1997).

Ces différentes voies d'adaptations permettent aux bactéries de réagir aux variations physiques, chimiques, et biologiques de l'environnement. Ces voies sont multiples et intègrent des systèmes de régulations très complexes. Elles vont dépendre à la fois de l'état physiologique bactérien et de la nature du stress. Les réponses adaptatives interagissent entre elles suivant les différents stress qu'ils soient de nature nutritive, oxydative, thermique, ou osmotique dans le cadre de protections croisées. Par exemple pour *Salmonella typhimurium*, la réponse adaptative via Fur a lieu en phase exponentielle de croissance, et celle via OmpR en phase stationnaire (Bang *et al.*, 2000; Rychlik et Barrow, 2005). La nature de l'acide qu'il soit organique ou inorganique va jouer un rôle. Un acide inorganique assure une stabilité du facteur  $\sigma^s$  en réduisant sa protéolyse (Rychlik et Barrow, 2005). Les acides faibles par contre stimulent la traduction du message de rpoS. Le système PhoPQ est également lié à l'action d'un acide inorganique alors que la présence d'acide organique favorise l'action de la protéine Fur (Bearson *et al.*, 1997; Foster, 1999; Rychlik et Barrow, 2005).



Figure 1 Représentation schématique des systèmes évoqués dans le texte, liés à la résistance et à l'adaptation au stress acide de <u>Listeria monocytogenes</u> d'après Cotter et Hill 2003 (2003) et Hill et al. (2002).



Figure 2 Représentation schématique des systèmes évoqués dans le texte, liés à la résistance et à l'adaptation au stress acide de <u>Salmonella typhimurium</u> d'après Abee et Wouters (1999) et Bearson et al. (1997)

## 1.1.2. Influence du stress acide sur la vitesse d'inactivation

L'utilisation de l'ensemble de ces mécanismes permet aux bactéries de maintenir le pH<sub>int</sub> à des valeurs compatibles avec le fonctionnement des voies métaboliques et de résister au stress. Néanmoins lorsque le stress se prolonge, la cellule bactérienne meurt ne disposant plus d'énergie ou étant trop altérée pour survivre. S'il semble évident que l'acidité de l'environnement va moduler la vitesse d'inactivation de populations bactériennes, l'adaptation au stress tient un rôle tout aussi important sur la modulation de la vitesse d'inactivation.

### Influence de l'acidité de l'environnement sur la vitesse d'inactivation

La grande majorité des études de la survie de populations bactériennes soumises à un stress acide est réalisée dans une gamme de pH 3 à 6. Ces études ont été effectuées aussi bien en milieu de culture acidifié qu'en aliment. Par contre, peu de travaux portent sur une gamme plus large de pH allant de pH très acides aux pH basiques. Pour une telle étude, le milieu de culture ou l'aliment doit être composé de manière à entraîner un stress de nature différente provoquant la mort des cellules bactériennes même à pH neutre. Un ou plusieurs facteurs peuvent être utilisés pour inhiber la croissance comme par exemple le chlorure de sodium, nitrate de sodium ou l'utilisation de fortes concentrations en acide faible neutralisé par une base forte (Buchanan *et al.*, 1993; Whiting, 1993; Buchanan *et al.*, 1994; Buchanan et Golden, 1994; Whiting *et al.*, 1996; Buchanan *et al.*, 1997). Le pH optimal de survie de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* est proche de la neutralité voire légèrement acide. Pour la première, il est proche de 6,5 ou de 6,0 en Bouillon cœur cervelle selon la nature du stress complémentaire associé (Whiting, 1993; Buchanan et Golden, 1994). Plus l'acidité de l'environnement s'éloigne de cet optimum, plus les bactéries sont sensibles aux variations de pH (Tetteh et Beuchat, 2003).



Figure 3 Influence du pH sur le temps nécessaire à 4 réductions décimales de <u>Listeria</u> <u>monocytogenes</u> ( $\triangle$  : 0,1M d'acide lactique, 28°C ;  $\diamond$  : 9% NaCl, 10°C)et <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> ( $\square$  : 9% NaCl, 10°C) d'après Buchanan et al. (1993) et Whiting (1993).

Etant donnée la variation de sensibilité de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* selon la gamme de pH étudiée, il n'est pas aisé de la quantifier avec l'ensemble des travaux effectués jusqu'à présent. En effet, en premier lieu les gammes de pH étudiées sont différentes, le milieu acidifié peut aussi bien être un aliment (mayonnaise, salades composées ou viande fraîche) qu'un milieu de culture modifié, et la diversité des souches utilisées est grande. De plus, la grande majorité des travaux ne considère que peu de niveaux de pH, se contentant d'étudier de manière qualitative les effets de l'acidification d'un aliment (2 à 3 niveaux de pH). De plus, les niveaux de pH sont souvent différents d'un travail à l'autre rendant difficile la comparaison de la sensibilité des souches et des espèces.

Toutefois dans la gamme de pH de 4 à 6, une diminution d'au moins 2 voire 3 unités est nécessaire pour augmenter la vitesse d'inactivation par un facteur 10 pour Listeria monocytogenes et Salmonella typhimurium (Whiting, 1993; Buchanan et Golden, 1994; Membre et al., 1997b; Buchanan et Golden, 1998). Certains travaux montrent une sensibilité plus élevée qui peut être due aux gammes de pH plus restreintes et relativement acides. La diminution de pH multipliant par 10 la vitesse d'inactivation est alors proche de l'unité. Par exemple pour Listeria monocytogenes, la vitesse d'inactivation est divisée par 4 en passant d'un pH de 4,0 à 4,5 en mayonnaise (Hwang et Tamplin, 2005), par 10 en augmentant le pH d'une unité au sein de « cottage cheese » (Hicks et Lund, 1991), et par 10 en augmentant le pH de 0,8 au sein de bœuf frais acidifié par un mélange d'acide lactique et d'acide acétique associés à leurs bases conjuguées (Samelis et al., 2001). Enfin en salade de poulet acidifiée par de l'acide acétique, le passage de pH 5,2 à 4,6 augmente de 20 % la vitesse de destruction et le passage de pH 4,6 à 4,0 l'augmente de plus de 350% (Guentert et al., 2003). Pour Salmonella, la baisse d'une unité pH par du jus de citron en salade tarama divise par 5 ou 7, selon l'étude, le temps nécessaire à la première réduction décimale (Koutsoumanis et al., 1999; Skandamis et al., 2002).

La nature de l'acidulant et sa concentration ont une grande influence sur la sensibilité des bactéries vis-à-vis d'un stress acide (Ahamad et Marth, 1989; Sorrells et Enigl, 1989; Conner et al., 1990; Ita et Hutkins, 1991). D'un point de vue physiologique, les acides organiques devraient être plus efficaces que les acides inorganiques (cf. paragraphe 1.1.1). Leur efficacité est due à leur capacité à traverser la paroi bactérienne sous la forme non dissociée. Plus un acide est dissocié, plus son pKa est faible. Il serait donc logique de pouvoir relier leur efficacité bactéricide à la valeur de leur pKa indépendamment du genre ou de l'espèce bactérienne. Pour Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium et Yersinia enterocolitica, l'efficacité bactéricide des acides correspond à l'ordre croissant de leur pKa: acide citrique (pKa<sub>1</sub>=3,13 ; pKa<sub>2</sub>=4,8 ; pKa<sub>3</sub>=6,4), acide lactique (pKa=3,86), acide acétique (pKa=4,76) (Ahamad et Marth, 1989; El-Shenawy et Marth, 1989; Conner et al., 1990; Abdul-Raouf et al., 1993; Little et al., 1994; Breand, 1998; Ryu et al., 1999; Vasseur et al., 1999; Zaika, 2001; Virto et al., 2005; Zaika et Phillips, 2005). Ces trois acides organiques sont les plus rencontrés dans la composition des aliments, en tant que conservateurs ou comme produits de fermentation et font l'objet de nombreuses études. Le tableau 1 regroupant les travaux de plusieurs auteurs illustre l'importance du pKa des différents acides sur leur pouvoir inactivateur. Il est à noter la grande variabilité de la sensibilité bactérienne à un stress acide que ce soit vis-à-vis de la concentration en acide total ou vis-à-vis du pH.

Il faut noter que ces études diffèrent sur de nombreux points : gammes de concentrations en acide faible, pH, température d'inactivation, mode de préparation des inocula, méthode d'estimation du nombre de survivants, revivification, agitation dans le cas de milieu liquide. Il n'est donc pas étonnant de retrouver des valeurs différentes de sensibilité.

Une caractéristique peut être mise en évidence à travers les travaux portant sur l'inactivation bactérienne due à un stress acide : les formes des courbes de survies évoluent avec le pH. En effet lorsque le stress acide est faible, la forme typique est une courbe

légèrement convexe. Puis plus le pH diminue, plus la courbe se creuse prenant une allure concave. L'application de stress acide de différentes intensités conduit à l'obtention de cinétiques de survie d'allure concave, convexe voire sigmoïdale (figure 4). Cette évolution pourrait s'expliquer par différentes sensibilités aux variations d'acidité au sein d'une population bactérienne.



Figure 4 Evolution de la forme des courbes de survie en fonction de l'intensité du stress acide à pH=3,5 ( $\diamond$ ), pH=3,2 ( $\triangle$ ), pH=2,5 ( $\circ$ ). Listeria en bouillon tryptone soja additionné d'extrait de levure à 35°C (d'après Samelis et al., 2001).

Tableau 1 Classement des acides selon leur efficacité bactéricide. L'efficacité acide et pH	
correspondent à l'ajout d'acide ou la diminution de pH nécessaire pour diviser par 10 la	
vitesse d'inactivation.	
	,

Acide	nKa	Microorganismes	Sensibilité		Gamme	Réf.	
Acide	рка	Wheroorganismes	à l'acide	au pH	étudiée de pH		
		E. coli		0,93	2,25-3,00	[1]	
chlorhydrique		L. monocytogenes		3	3,00-6,00	[2]	
		S. typhimurium		3	4,80-6,00	[3]	
tartrique	3,04-4,37	L. monocytogenes				[4]	
						[5]	
		E. coli		0,68	2,50-3,10	[1]	
						[6]	
•. •			1,7% (0,09 M)		3,60-7,15	[7]	
citrique	3,13–4,8–6,4	L. monocytogenes				[4]	
			<b>2 M</b> (200/)	2	4 00 7 00	[8]	
			2 M (38%)	5	4,00-7,00	[9]	
		Y. enterocolitica	14,29% (0,74M)		1,3-2,3	[10]	
		E coli				<u>[11]</u>	
malique	2 10-5 93	E. COII				[0]	
manque	5,40-5,25	L. monocytogenes	0.5 M (6.7%)	3,5	3 00-6 00	[14]	
formique	3 75	I monocytogenes	0,3 WI $(0,770)$		5,00-0,00	[12]	
Torrinque		L. monocytogenes				[5]	
		E coli		0 39	3 20-3 60	[1]	
		L. Con		0.87	3 90-5 40	[6]	
			1 3% (0 14 M)	0,0,	3 60-7.15	[7]	
			1,270 (0,1		5,00 7,10	[12]	
						[14]	
lactique	3,86	-				[4]	
<b>1</b>	- ,	L. monocytogenes				[15]	
						[8]	
				1,5	3,00-6,00	[2]	
			1,5 M (13%)	3	3,50-7,00	[16]	
		S. typhimurium		3	3,50-7,00	[16]	
		Y. enterocolitica	1,13% (0,12 M)		1, <u>5-2,5</u>	[10]	
benzoïque	4,18	L. monocytogenes				[11]	
						[12]	
		F coli		0,18	4,70-5,40	[5]	
		E. COII		0,37	3,60-4,00	[1]	
				1,5	3,90-5,40	[6]	
acétique	4 76		1% (0,16 M)		4,6-5,2	[17]	
uconque	1,70					[7]	
		L. monocytogenes				[14]	
						[4]	
		** 1	0,5 M (3%)	1,5	3,00-6,00	[15]	
1 .	4.00	Y. enterocolitica				[8]	
sorbique	4,80	L. monocytogenes				[2]	
propionique	4,8/	L. monocylogenes				[11]	
[1] (Breand, 199 [5] (Abdul-Raou 1993); [9] (Buc Park, 2001); [1	8); [2] (Buchana If <i>et al.</i> , 1993); [ chanan et Golder 3] (Buchanan et	ın <i>et al.</i> , 1993) ; [3] (M 6] (Ryu <i>et al.</i> , 1999) ; 1, 1994) ; [10] (Virto <i>ε</i> Golden, 1998) ; [14] (	lembre <i>et al.</i> , 1997b [7] (Ahamad et Mar <i>et al.</i> , 2005) ; [11] ( [Conner <i>et al.</i> , 1990	);[4] (EI- th, 1989) Little <i>et</i> ); [15] (	-Shenawy et Marth ; [8] (Young et Fo <i>al.</i> , 1994); [12] ( Vasseur <i>et al.</i> , 19	n, 1989 begedin Barker 99) ; [	

#### Influence de l'adaptation au stress acide sur la vitesse d'inactivation

L'adaptation au stress acide s'effectue par l'augmentation des mécanismes de résistance (cf. paragraphe 1.1.1.). Cette adaptation peut être spécifique du stress acide, non spécifique, ou générale. Dans ce cas, le développement des mécanismes caractéristiques de la résistance à l'acidité est obtenu en incubant les cellules à un pH sublétal. Mais, l'augmentation de la résistance au stress acide peut être acquise par le développement de mécanismes de résistance croisée non spécifiques au stress acide. Cette adaptation peut être générée par l'exposition à un stress osmotique, un stress thermique (froid ou chaud) ou une carence nutritive. Les cellules issues de la phase stationnaire de croissance font l'objet d'une adaptation générale au stress regroupant l'ensemble des mécanismes de résistance, à la fois spécifiques et non spécifiques, au stress étudié. L'adaptation spécifique au stress acide des cellules issues de la phase stationnaire (Lee *et al.*, 1994; Phan-Thanh *et al.*, 2000; Greenacre *et al.*, 2003).



Figure 5 Courbes de survie de <u>Listeria monocytogenes</u> (a) et <u>Salmonella typhimurium</u> (b) soumis à un stress de pH=3,0 (HCl) en bouillon tryptone soja additionné de 1% de glucose à 20°C. Les inoculums initiaux sont non adaptés (•) ou exposé préalablement à un pH=5,5 (acide lactique) durant 1h ( $\circ$ ), 2h ( $\triangle$ ), 3h ( $\nabla$ ), 5h ( $\Diamond$ ), 6h ( $\Box$ ) (d'après Greenacre et al., 2003).

Les cellules issues d'une culture en phase stationnaire de croissance sont 1000 fois plus résistantes que des cellules adaptées issues de phase exponentielle de croissance (Lee *et al.*, 1994). L'utilisation d'acide lactique est plus performante que celle de l'acide citrique pour l'adaptation au stress acide. L'adaptation pour ces acides est maximale au bout de 2 à 3 heures d'exposition pour un pH égal à 5,5 (Faleiro *et al.*, 2003; Greenacre *et al.*, 2003). Au delà de ce temps d'exposition la résistance diminue. Le pH optimal d'adaptation pour 90 minutes d'exposition à un bouillon de culture acidifié par l'acide lactique est de 5,0 pour *Listeria monocytogenes* et *Escherichia coli*, et de 4,5 pour *Salmonella typhimurium* (Koutsoumanis et Sofos, 2004).

Plus les cellules de *Listeria monocytogenes* ou de *Salmonella typhimurium* sont résistantes, plus la forme de la cinétique est simple. D'allure convexe pour des cellules en issue de phase stationnaire de croissance ou préalablement adaptées, les courbes passent à une allure concave pour des cellules non adaptées. Pour ces cellules, les premiers temps d'exposition au stress acide mettent en évidence une grande proportion de cellules sensibles. En effet la vitesse d'inactivation est alors très rapide. Lorsque le temps d'exposition au stress se prolonge, la vitesse d'inactivation est alors plus lente mettant en évidence une population résiduelle plus résistante (figure 5).

En 1994, Buchanan et Golden ont étudié l'impact de la température, de la concentration en chlorure de sodium, en nitrite de sodium et en acide lactique sur l'inactivation de *Listeria monocytogenes*. Sous certaines conditions, ils observent des courbes de survie avec une traînée. Les auteurs isolent les individus composant la traînée, les remettent en culture, puis leur soumettent un stress identique. Les courbes de survie obtenues sont identiques aux courbes initiales de survie. La résistance accrue des cellules composant la traînée ne peut donc pas être attribuée à des spécificités intrinsèques, mais à des conditions de stress ou des états physiologiques favorable à leur survie.

### Variabilité inter souche de la résistance au stress acide

A travers l'ensemble des travaux portant sur le stress acide, les différentes souches étudiées de *Listeria monocytogenes* ou de *Salmonella typhimurium* semblent adopter les mêmes voies de réponse physiologique au stress acide. Les courbes de survie évoluent de la même manière en fonction de l'état physiologique de l'inoculum et de l'intensité du stress. Toutefois d'un point de vue quantitatif, le temps nécessaire pour réduire la population initiale de une, deux, trois ou quatre réductions décimales est très variable selon les souches.

Par exemple pour un même mode de préparation de l'inoculum et des conditions de stress identiques, parmi 9 souches de *Listeria monocytogenes*, le taux de survie varie de moins de 0,03% à 18,76% équivalent à 3,52 et 0,72 réductions décimales (Faleiro *et al.*, 2003). La même diversité est observée pour plus de 30 souches d'origines différentes de *Listeria monocytogenes* ou de *Salmonella typhimurium* (Dykes et Moorhead, 2000; Berk *et al.*, 2005). Après un stress à pH=2,5 (HCl) de 2 heures, appliqué à des cellules issues de la phase exponentielle de croissance, certaines souches sont capables de résister 10000 fois plus que d'autres pour les deux espèces étudiées (figure 6). Lorsque les cellules sont adaptées la résistance médiane augmente et la distribution de la résistance s'élargie. Cette grande diversité de la résistance au stress n'est pas typique de ces deux espèces, puisque pour *Escherichia coli*, parmi 14 souches soumises au même stress, le nombre de réductions décimales s'échelonne de 0,004 à 3 et pour *Shigella flexneri* de 0,008 à 1,5 (Benjamin et Datta, 1995).

La variabilité de la réponse au stress a été étudiée presque exclusivement dans le cas du stress acide. Une seule étude s'interesse au stress acide osmotique et la même variabilité est observée avec une exposition à 20% de NaCl, le nombre de réductions décimales allant de 1 à 4 pour des cellules adaptées (pH 5,5 acide lactique) et de 1,19 à 5,33 pour des cellules non adaptées (Benjamin et Datta, 1995).



Figure 6 Nombre de réductions décimales pour 30 souches de <u>Listeria monocytogenes</u> suite à une exposition à un pH de 2,5 durant  $1h = et 2h \square$  ou pour 30 souches de <u>Salmonella</u> typhimurium 1h à pH 2,5 en gris  $\blacksquare$  (d'après Dykes et Moorhead, 2000; d'après Berk et al., 2005).

## 1.2. Le stress osmotique

La diminution de l'activité de l'eau dans les aliments est une méthode usuelle pour la conservation des aliments. Elle s'effectue le plus souvent par séchage ou par l'incorporation de dépresseur dans les aliments (sels, sucres, solvants miscibles à l'eau). La turgescence est nécessaire à la l'élongation cellulaire, permettant de garder la membrane plasmique proche de la couche de peptidoglycane. Les cellules bactériennes doivent donc maintenir leur turgescence cellulaire quelles que soient les variations de l'environnement. Les micro-organismes doivent donc maintenir une pression osmotique interne supérieure à celle de leur environnement pour assurer leur croissance. Cette pression de turgescence est de l'ordre de 20 bars pour les bactéries Gram positif et de 3 à 10 bars pour les bactéries Gram négatif (Sleator et Hill, 2002). Cependant la paroi bactérienne est très perméable à l'eau et ne présente pas de mécanisme particulier d'importation. Lorsque des variations de la pression osmotique de l'environnement se produisent, on assiste à un transfert passif de l'eau répondant au gradient osmotique.

## 1.2.1 Dommages et mécanismes de résistance au stress osmotique

En cas de choc hypo-osmotique, l'eau entre massivement dans la cellule bactérienne. Pour éviter ce gonflement conduisant à la lyse cellulaire, les solutés intracellulaires sont libérés dans l'environnement. Cette libération est effectuée par le biais de transporteurs spécifiques ou de pores activés par les variations de tension membranaire. La présence d'aquaporines a été mise en évidence chez *Escherichia coli* permettant d'accélérer le passage

de l'eau vers l'extérieur de la cellule (Calamita, 2000). Dans le cas d'un choc hyperosmotique, l'eau sort de la cellule provoquant une baisse de la turgescence et un rétrécissement du cytoplasme, pouvant aller jusqu'à la plasmolyse. L'accumulation de solutés dans le cytoplasme permet d'inverser le gradient osmotique et de restaurer la turgescence cellulaire. Dans un premier temps, de petites molécules chargées sont accumulées, en général l'ion potassium (K<sup>+</sup>), il s'agit de la réponse dite primaire. Mais de fortes concentrations en molécules chargées réduisentt l'activité enzymatique et peuvent donc conduire à la mort cellulaire par l'altération des voies métaboliques. Progressivement, les molécules chargées sont remplacées par des solutés dits compatibles. Cette seconde phase est dite réponse secondaire.

### La réponse primaire

La régulation de la pression osmotique des bactéries s'effectue en deux étapes mettant en œuvre des mécanismes complexes de transport et de biosynthèse (figure 7). La réponse primaire correspond à l'accumulation de molécules chargées, nécessaire au rétablissement de la turgescence cellulaire. L'accumulation de l'ion potassium est généralement observée dans les premiers instants suivant le stress osmotique. La majeure partie des travaux sur ce phénomène porte sur *Escherichia coli*, mais elle peut être extrapolée à *Salmonella typhimurium*. Cette accumulation de potassium est rattachée principalement à l'action de deux systèmes d'importation Kdp (K<sup>+</sup> DePandence) et Trk (Transport K<sup>+</sup>).

L'importation de  $K^+$  est en grande partie due au transporteur Kdp hautement spécifique au potassium. Principalement utilisé pour l'homéostasie en  $K^+$ , ce transporteur nécessite un apport énergétique sous forme d'ATP (transporteur ABC). Il est régulé au niveau de sa transcription et de son activité par les variations de pression osmotique. Lors d'une baisse de turgescence, la kinase KdpD s'autophosphoryle et transfère son groupement phosphorylé au régulateur de réponse KdpE qui active alors l'expression de l'opéron *kdpFABCDE*. Cette activation est transitoire puisque la phosphorylation de KdpD est réprimée par l'accumulation de potassium. Ce système permet une accumulation rapide mais brève d'ions potassium, évitant ainsi l'accumulation létale de molécules chargées (Gutierrez *et al.*, 1995; Kempf et Bremer, 1998; Wood, 1999; Wood *et al.*, 2001; Sleator et Hill, 2002).

Le second système d'importation, Trk, est prédominant pour des concentrations plus élevées en potassium. Jouant un rôle important dans l'homéostasie en K+, il est l'acteur majeur de la réponse au stress osmotique. De plus faible affinité, ce système est composé par TrkG et TrkH des transporteurs de potassium, et TrkA et TrkE qui module leurs activités. TrkA active les transporteurs par l'ATP ou via une protéine kinase. TrkE présente un domaine de régulation qui inhibe le transport de K+ par TrkG et TrkH. D'autres systèmes d'importation de K+ existent chez *Escherichia coli* comme Kup (K<sup>+</sup> UPtake, transporteur de Césium et de K+) ou TrkF, mais ils ont une très faible affinité pour le potassium et ne semblent pas jouer de rôle dans la réponse au stress osmotique (Gutierrez *et al.*, 1995; Kempf et Bremer, 1998; Wood, 1999; Wood *et al.*, 2001; Sleator et Hill, 2002).

Le glutamate est utilisé pour contrebalancer l'augmentation de la charge positive au sein de la cellule, due à l'importation de potassium. Les bactéries Gram négatif le synthétisent ou l'importent (Sleator et Hill, 2002). Le glutamate est retrouvé en concentration plus faible chez les bactéries Gram positif. Ces bactéries possèdent en condition non stressante un pool d'acides aminés plus important que les bactéries Gram négatif. Le glutamate est majoritaire au sein de ce pool d'acides aminés, d'où peut-être la moindre nécessité de synthétiser du glutamate. Les travaux sont moins fournis pour les bactéries Gram positif, mais comme pour les bactéries à Gram négatif, il apparaît que cette accumulation de potassium dépendante du

stress osmotique est nécessaire pour l'initiation de la deuxième étape de la réponse au stress osmotique : l'accumulation de solutés compatibles.



Figure 7 Représentation schématique des systèmes évoqués dans le texte, liés à la résistance et à l'adaptation au stress osmotique de <u>Listeria monocytogenes</u> et de <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u>. En noir et gras les éléments spécifiques à <u>Salmonella typhimurium</u> et en gris les éléments spécifiques à <u>Listeria monocytogenes</u>. d'après Pichereau et al. (2000) et Sleator et Hill (2002)

### La réponse secondaire

La réponse secondaire correspond à l'accumulation de solutés compatibles. Les solutés compatibles sont en général de petites molécules sans charge nette à pH physiologique, hautement solubles, et vis-à-vis desquels la perméabilité membranaire est contrôlée (Gutierrez *et al.*, 1995; Poolman et Glaasker, 1998; Pichereau *et al.*, 2000; O'Byrne et Booth, 2002; Sleator et Hill, 2002). L'accumulation à de fortes concentrations de solutés compatibles n'altère pas le fonctionnement enzymatique, et aurait plutôt tendance à protéger les enzymes de la dénaturation par les sels. Ils permettent ainsi le maintien des mécanismes de réparation de l'ADN et du métabolisme. Ces solutés peuvent être des amines quaternaires (bétaine, carnitine), acides aminés (proline), dérivés d'acides aminé (proline bétaine), sucres (tréhalose, mannitol), et même de petits peptides.

La glycine bétaine est le soluté compatible le plus répandu chez les bactéries ainsi que dans le règne animal et végétal. Son accumulation peut s'effectuer par synthèse ou par un système d'importation (Gutierrez et al., 1995; Wood et al., 2001; Sleator et Hill, 2002). La synthèse de la glycine bétaine s'effectue à partir de choline ou de carnitine. Concernant Salmonella typhimurium, la choline est accumulée dans le cytoplasme par deux transporteurs, l'un de haute affinité, BetT (BETaine) ; et l'autre de basse affinité, ProU (PROline). Elle est ensuite oxydée par l'enzyme BetA (choline déshydrogénase) donnant un intermédiaire de forme aldéhydique oxydé en glycine bétaine par l'enzyme BetB. L'addition de choline pendant un stress augmente la transcription des gènes BetA, BetB et BetT, et réprime l'expression d'un répresseur capable de percevoir la présence de choline, Betl. Un principe similaire est rencontré chez Bacillus subtilis. La choline est importée par les transporteurs OpuB et OpuC, puis oxydée par les enzymes GbsB, et GbsA pour donner de la glycine bétaine en passant par un intermédiaire de forme aldéhydique. L'expression de l'opéron gbsAB est induite en présence de choline. En théorie Listeria monocytogenes possède le matériel nécessaire pour réaliser la synthèse de glycine bétaine en utilisant la choline en précurseur, mais cette voie n'a pas été mise en évidence pour le moment.

Pour *Salmonella typhimurium*, les transporteurs majeurs impliqués dans la réponse au stress osmotique sont ProP et ProU (Gutierrez *et al.*, 1995; Poolman et Glaasker, 1998; Pichereau *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2001; Sleator et Hill, 2002). ProP permet le passage de bétaine, proline et d'ectoïne. Ce transporteur a une affinité modérée pour la glycine bétaine. Toujours exprimée, sa transcription du gène codant pour ProP est néanmoins soumise à la régulation par deux promoteurs. Le complexe cAMP-CRP va inhiber le premier, et le facteur  $\sigma^{S}$  associé à la protéine Fis (protéine s'associant au nucléotide) va augmenter la transcription par l'intermédiaire du second transporteur. L'induction transcriptionnelle va permettre d'augmenter l'activité d'importation d'un facteur de 2 à 5. Par contre, l'activation biochimique du transporteur permet de moduler l'activité d'un facteur supérieur à 5. La variation de la partie C terminale de ProP, ce qui permettrait son activation en cas de pression osmotique élevée.

Le deuxième transporteur ProU appartient à la famille des transporteurs ABC (Gutierrez *et al.*, 1995; Poolman et Glaasker, 1998; Pichereau *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2001; Sleator et Hill, 2002). Il a une grande affinité pour la glycine bétaine. Contrairement à ProP, son activité d'importation dans la cellule est fortement dépendante de la voie transcriptionnelle par rapport à son activation par la voie biochimique. En conditions normales, deux régions riches en AT situées dans l'opéron de ProU permettent à la protéine H-NS de se former un complexe nucléoprotéique. Ce complexe liant la protéine en deux points de l'opéron provoque un enroulement de l'ADN empêchant la liaison de l'ARN polymérase. En cas de forte osmolarité, c'est une cascade de complexes protéine-protéine qui va conduire à la libération de l'ADN par H-NS. L'expression de ProU peut être alors encore augmentée par le rôle de deux promoteurs reconnus par RpoD et RpoS. La régulation de l'activité du transporteur s'effectue par le biais de ProW (protéine membranaire constituant ProU) dont une région capte à la fois les variations de tension membranaire mais aussi les variations de l'osmolarité intracellulaire.

Trois systèmes différents permettent l'accumulation de glycine bétaine chez *Listeria monocytogenes* (Hill *et al.*, 2002; Sleator et Hill, 2002). Le premier, BetL, est hautement spécifique à la glycine bétaine. Ce transporteur est osmotiquement induit par la voie transcriptionnelle et par l'activité enzymatique. Le deuxième OpuC transporte également la carnitine. De la famille des transporteurs ABC, il est activé par des perturbations de la membrane plasmique. Le troisième, GbuABC transporte également la carnitine. La régulation transcriptionnelle s'effectue par rétrocontrôle. Ainsi l'accumulation de carnitine inhibe

l'activité du transport vis-à-vis de la carnitine et de la bétaine. L'accumulation de petits peptides ou d'acides aminés peut également conduire à l'inhibition de ce transporteur. En effet, *Listeria monocytogenes* a la spécificité de pouvoir accumuler ces molécules dans un but d'osmorégulation. Cette accumulation permet d'augmenter la turgescence. Ce serait donc soit les solutés qui interagiraient avec la face cytoplasmique du transporteur, soit l'augmentation de la turgescence qui conduirait à l'inhibition du transporteur.

La carnitine est très courante dans la nature. Elle est importée par ProU et ProP chez *Salmonella typhimurium*, et par OpuC chez *Listeria monocytogenes* (Gutierrez *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2002; Sleator et Hill, 2002). Par contre, la proline est accumulée de façon différente chez les bactéries (Gutierrez *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2002; Sleator et Hill, 2002). En effet, elle est synthétisée chez les bactéries gram positif et transportée chez les autres. Le précurseur de la synthèse de la proline est le glutamate. Trois enzymes sont nécessaires à cette voie de synthèse unique chez *Listeria monocytogenes*, une kinase produit de *proB*, deux réductases produites de *proA* et *proB*. La kinase est régulée par rétrocontrôle par l'accumulation de proline. Chez *Salmonella typhimurium*, le transport est effectué par ProU et ProP en particulier. PutP peut également contribuer à l'importation de proline mais essentiellement dans le but de l'utiliser comme source de carbone.

Le tréhalose est accumulé par synthèse en absence de solutés compatibles. Rencontrée chez *Salmonella typhimurium*, la biosynthèse du tréhalose se réalise en deux phases. L'enzyme ostA permet la synthèse de tréhalose-6-phosphate en condensant du glucose-6-phosphate et de l'UDP-glucose. Le tréhalose est alors produit à partir de l'intermédiaire par une tréhalose-6-phosphatase (otsB). L'opéron *otsAB* (Osmoregulated Trehalose Synthesis) est sous dépendance du facteur  $\sigma^{S}$  largement exprimé en cas de forte pression osmotique (Gutierrez *et al.*, 1995; Kempf et Bremer, 1998; O'Byrne et Booth, 2002).

## 1.2.2. Influence de l'activité de l'eau sur la vitesse d'inactivation

Si le rôle de l'activité de l'eau est présenté dans de nombreux travaux portant sur l'inactivation bactérienne, ces études se limitent à l'étude de l'influence de la concentration en chlorure de sodium de milieu synthétique ou d'aliment. La majorité des travaux ont pour objectif l'optimisation de l'activité de l'eau d'aliments, ils comportent le plus souvent peu de niveaux pour le facteur étudié. Deux gammes d'activité de l'eau sont étudiées, une très basse correspondant aux produits secs ou déshydratés, la seconde allant de 0,70 à 1,00 correspondant à la majorité des produits alimentaires (condiments, fromages, saumure, produits de salaison ou de charcuterie).

Dans une gamme basse d'activité de l'eau, la baisse de l'activité de l'eau protège de l'inactivation les microorganismes. Sperber (1983) rapporte que la chute d'activité de l'eau de 0,71 à 0,34 divise la vitesse d'inactivation par un facteur de 2 à 4, selon la température, les bactéries du genre *Salmonella* dans des produit à base de poisson. Pour un passage de 0,51 à 0,11 en activité de l'eau, la vitesse d'inactivation de population d'*Escherichia coli* et de *Streptococcus faecalis* augmente d'un facteur 10 en café, poudre de lait et pommes de terre séchées (Sperber, 1983). Au sein de luzerne déshydratée à 0,20 d'activité de l'eau, un mélange de différentes espèces du genre *Salmonella* survit 100 fois plus qu'à 0,60 (Beuchat et Scouten, 2002).

Un plus grand nombre d'études porte sur une gamme plus élevée d'activité de l'eau. Deux plages d'activité de l'eau peuvent être distinguées. De 0,70 à environ 0,90, les variations d'activité de l'eau semblent avoir peu d'influence. En saumure contenant 10% à 25% de chlorure de sodium, équivalent à une activité de l'eau respectivement de 0,93 et 0,75, *Listeria monocytogenes* est capable de survivre durant plus de 200 jours (Larson *et al.*, 1999). Dans cette gamme d'activité de l'eau, l'ajout de chlorure de sodium à la composition de

fromage n'a pas ou peu d'effet. Il peut augmenter légèrement la vitesse d'inactivation pour *Escherichia coli* ou n'avoir aucun effet pour *Listeria monocytogenes* (Erkmen, 2000; Lekkas *et al.*, 2006). Une étude en chorizo montre qu'en dessous de 0,92 les variations d'activité de l'eau ne jouent pratiquement pas sur la vitesse d'inactivation (figure 8). Il est alors nécessaire d'abaisser d'au moins 0,2 l'activité de l'eau pour que la vitesse d'inactivation soit multipliée par 10. Par contre pour les activités de l'eau plus élevées, une variation de 0,02 entraîne une variation par 10 de la vitesse de destruction (Hajmeer *et al.*, 2006). En bouillon cœur cervelle, *Listeria monocytogenes* a le même comportement (Miller, 1992). Aux activités de l'eau élevées, une variation de 0,10 ou 0,07 due à l'addition respectivement de chlorure de sodium et de propylène glycol augmente la vitesse d'inactivation d'un facteur 10. La sensibilité aux variations d'activité de l'eau est deux fois plus importante pour les valeurs supérieures à 0,90 indépendemment des auteurs et des milieux utilisés (tableau 2).

Tableau 2 Valeur de l'activité de l'eau (Aw seuil) à partir de laquelle la sensibilité des microorganismes vis-à-vis de l'addition de dépresseur change.

Genre espèce	Aw seuil	Dépresseur	milieu	Réf.
	0,87	Propylène	BHI	(Miller, 1992)
	0,87	Chlorure de	BHI	(Miller, 1992)
Listeria monocytogenes	0,91	Chlorure de sodium	TSB	(Shahamat et al., 1980)
	0,92	Chlorure de sodium	BHI	(Whiting, 1993)
Salmonella typhimurium	0,94	Chlorure de sodium	BHI	(Whiting, 1993)
Salmonella spp.	0,92	Chlorure de sodium	chorizo	(Hajmeer <i>et al.</i> , 2006)



Figure 8 Influence de l'activité de l'eau de chorizo (NaCl utilisé en tant que dépresseur) sur la durée nécessaire à la première réduction décimale (D) de <u>Salmonella spp.</u> incubées à 6°C ( $\circ$ ), 25°C ( $\Delta$ ) et 30°C ( $\delta$ ) (d'après Hajmeer et al., 2006).
# 1.3. Influence de la température lors d'un stress

La température est l'un des facteurs ayant le plus d'impact sur le comportement bactérien dans les aliments. Impliquée dans toutes les réactions cellulaires, la température est probablement le facteur environnemental ayant fait l'objet du plus grand nombre d'études. Directement responsable de la mort cellulaire dans le cadre de traitements thermiques ou de la survie bactérienne dans le cadre de la congélation, la température module la vitesse de croissance pour les températures compatibles avec le développement bactérien. Cette gamme de température est variable selon les microorganismes et leur environnement. Elle s'étend environ de 0°C à 45°C pour *Listeria monocytogenes* et de 5°C à 45°C pour *Salmonella typhimurium* (ICMSF, 1996; Membre *et al.*, 2005). Dans cette gamme, les diminutions de température influencent les réponses des populations bactériennes directement par une réduction de l'activité enzymatique, modification de la composition cellulaire, modification des besoins nutritifs, ou indirectement en modifiant la solubilité des solutés, le transport des ions, les propriétés de diffusion à travers la paroi, les effets osmotiques sur la membrane ou encore la tension de surface et la densité (Abee et Wouters, 1999; Beales, 2004).

# 1.3.1 Nature de l'effet protecteur des basses températures

Les basses températures appartenant à la gamme de croissance des microorganismes ne peuvent pas être tenues pour responsable de la mort cellulaire, mais associées à un stress létal, elles favorisent la survie des microorganismes (figure 9). L'effet protecteur des basses températures dans le cas d'un stress létal acide n'a été observé que pour des cellules de *Salmonella typhimurium* en phase stationnaire. Pour des cellules issues de la phase exponentielle, la diminution de la température n'a pas ou peu d'effet sur la survie bactérienne (Gawande et Bhagwat, 2002). Le rôle protecteur de la température ne peut donc pas être rattaché directement à son action physique ou biochimique, mais il semble fortement lié aux mécanismes de résistance induits en phase stationnaire. Les mécanismes de résistance aux stress acide ou osmotique pouvant expliquer l'effet protecteur des températures froides sont la modification de la composition de la membrane, la variation de structure des protéines ou de l'ADN, l'expression de protéines de stress froid et l'accumulation de solutés compatibles.



Figure 9 Effet de la température sur le nombre de réduction décimale engendré par un stress acide en tampon citrate (pH=3,0) sur des cellules de <u>Salmonella typhimurium</u> en phase stationnaire de croissance en noir, ou en phase exponentielle en gris (d'après Gawande et Bhagwat, 2002).

### Modification de la fluidité membranaire

La diminution de la température provoque une diminution de la fluidité membranaire. Lorsque la température diminue, les composants de la membrane normalement fluides se figent empêchant un fonctionnement normal des constituants de la membrane. Dans ces conditions, les microorganismes n'ont pas la capacité énergétique d'activer leurs transporteurs membranaires. Le transport des ions, des nutriments, et la respiration par le maintien de la force proton motrice ne sont plus assurés. Pour faire face à ces phénomènes, la composition lipidique de la membrane bactérienne change à basse température. Les acides gras courts et insaturés sont préférés. Chez Escherichia coli, l'acide vaccenique (C18:1) est préféré à l'acide palmitique ( $C_{16:0}$ ) (Annous *et al.*, 1997). L'augmentation de la teneur en acides gras insaturés crée de l'instabilité au sein de la membrane. La réduction des acides gras cycliques est observée chez Salmonella typhimurium au profit des acides gras linéaires (Russell, 1984). Enfin, chez Listeria monocytogenes, la teneur en acide gras C<sub>15:0</sub> augmente au détriment des acides gras en C<sub>17:0</sub> (Carty et al., 1999). En effet, la présence d'acides gras plus courts permet de diminuer le nombre d'interactions carbone-carbone entre les phospholipides augmentant l'instabilité de la membrane. Cette synthèse des acides gras aux basses températures est régulée par un changement de configuration spatiale de l'ADN à ces températures (Hurme et Rhen, 1998).

### La configuration spatiale de l'ADN

L'activité de certains promoteurs est en relation avec la configuration spatiale de la double hélice. Deux enzymes, une topo-isomérase et une gyrase permettent des variations de courbure de l'ADN. Les facteurs qui régulent leurs actions sont complexes, mais la température tient une grande part dans leur régulation. La synthèse des acides gras, nécessaire à la survie des bactéries, la régulation de l'équilibre ATP/ADP ou de l'osmolarité cellulaire mais aussi l'activation les voies métaboliques anaérobie sont rendues possibles aux basses températures par ce changement de configuration spatiale (Hurme et Rhen, 1998). Les protéines de type H-NS sont, elles aussi, impliquées dans la régulation des mécanismes de résistance aux basses températures. En effet, leur structure change en fonction de la température altérant leur capacité à se fixer sur l'ADN. H-SN a un rôle répresseur sur l'expression des gènes. En libérant l'ADN aux basses températures, elle permet la transcription de gènes d'intérêt pour la bactérie.

### Les protéines exprimées dans le cas de stress froid

Dans le cas de fortes chutes de température, les bactéries synthétisent massivement des petites protéines. Ces protéines de stress sont impliquées dans la synthèse des protéines et le suivi des ARNm aux faibles températures (Thieringer *et al.*, 1998; Abee et Wouters, 1999; Ramos *et al.*, 2001; Beales, 2004). La synthèse des protéines de stress froid est induite en cas de choc froid mais elles peuvent être également exprimées en phase stationnaire de croissance, lors de la division cellulaire et lors la condensation chromosomique, ou dans le cas de l'application de hautes pressions où elles permettent de lutter contre l'inactivation des ribosomes (Abee et Wouters, 1999). Les protéines CspA (Cold Shock Proteins) produites par *Escherichia coli* et CspB produites par *Bacillus subtilis* ont un rôle majeur dans la réponse à un stress froid. Comme la plupart des protéines de ce type, elles ont la capacité de se lier à l'ADN en reconnaissant un motif en Y (ATTGG) et elles possèdent également deux motifs de liaison à l'ARN. CspA<sup>E</sup> et CspB<sup>B</sup> augmentent la transcription de la gyrase GyrA et de H-NS. Elles jouent aussi le rôle de protéine chaperonne facilitant la traduction à basse température. La spécificité de cette famille de protéines vis-à-vis de la température est rendue possible

grâce à une région non traduite de leurs ARNm qui permet leur traduction aux températures froides.

D'autres protéines permettent aux bactéries de répondre au stress froid (Abee et Wouters, 1999; Liu *et al.*, 2002; Beales, 2004). Elles sont impliquées dans la recombinaison, la transcription (NusA : N (phage lambda protein) utilization substance), l'activité ribosomale (RbfA : Ribosome binding factor, CsdA : CDP diglyceride synthase), la dégradation de l'ARNm (phosphorylase nucléotidique), dans la réparation ou la dégradation des protéines endommagées ou agglomérées (GroEL : Growth of phage, ClpP ClpB : Caseinolytic protease). Et de façon plus générale, elles permettent le maintien des fonctions métaboliques, la chémostase et l'importation de sucre ou de solutés compatibles.

### Les solutés compatibles

Les baisses de température entraînent la déstabilisation de la structure tertiaire des protéines. L'accumulation de solutés compatibles améliore à la fois la stabilité structurelle des protéines, mais pourrait avoir aussi un effet fluidifiant sur la membrane (Ko *et al.*, 1994; O'Byrne et Booth, 2002). Certains transporteurs de solutés compatibles peuvent être activés à basse température en absence de stress osmotique, c'est le cas de OpuC et de Gbu de *Listeria monocytogenes* (Gerhardt *et al.*, 2000; Angelidis *et al.*, 2002; Duche *et al.*, 2002). L'augmentation de la concentration en glycine bétaine ou de la carnitine autorise alors le maintien de l'activité enzymatique et donc celui de l'activité métabolique (Abee et Wouters, 1999; Dykes et Moorhead, 2000; Wood *et al.*, 2001). L'augmentation de l'activité d'importation à basse température est régulée en grande partie par le facteur  $\sigma^B$  (Becker *et al.*, 2000; Gawande et Bhagwat, 2002; Brondsted *et al.*, 2003).

# 1.3.2. Influence de la température sur la vitesse d'inactivation

En fonction de la gamme de température, de 4 à 15°C ou de 15 à 45°C, les variations de température n'ont pas le même effet sur la vitesse d'inactivation de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella typhimurium* (figure 10). Deux, trois ou quatre niveaux de température sont en général étudiés. Sur une gamme de température allant de 4 à 40°C, il est difficile d'évaluer la sensibilité des bactéries aux températures élevées et aux températures froides avec aussi peu de niveaux. Néanmoins, le passage de 4 à 30°C multiplie par 10 environ la vitesse d'inactivation de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella typhimurium* quelle que soit la nature du stress. Quelques études montrent une sensibilité moindre au sein d'aliments, ou alors plus forte mais elles sont minoritaires (tableau 3). Pour les températures élevées, une augmentation de la température de 20°C multiplie par 10 la vitesse d'inactivation. Par contre, un effet peu marqué est observé pour les basses températures comprises entre 4 et 15°C.

Si l'abaissement de la température a un effet protecteur sur les populations bactériennes, certains travaux mettent en évidence un optimum de survie proche de 12°C. En bouillon d'enrichissement pour *Listeria monocytogenes* ou en mayonnaise, les vitesses d'inactivation à 4°C et 8°C sont équivalentes et plus élevées qu'à 12°C (Membre *et al.*, 1997a; Hwang et Tamplin, 2005). En produits riches en graisses, la survie de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella typhimurium* est plus élevée à 10°C qu'à 4,4°C et 21,0°C (Holliday et Beuchat, 2003). Et des études ayant pour objectif de modéliser la survie de *Listeria monocytogenes* et de *Salmonella typhimurium* prédisent un optimum de survie aux environs de 12°C pour les deux germes (Whiting, 1993; Buchanan *et al.*, 1994). Cependant, l'observation de cet optimum est rare. La température ayant un effet presque nul pour les zones froides, l'observation de cet optimum pourrait s'expliquer par un manque de précision

sur les mesures et/ou une insuffisance de niveaux de températures. Il pourrait également s'expliquer dans certeins cas par un développement plus favorable de la flore annexe aux environs de 12°C. Cette croissance de la flore annexe est accompagnée d'une modification du milieu, le rendant plus propice à la survie (Lekkas *et al.*, 2006).

L'effet de la température ne consiste pas seulement en la modulation de la vitesse d'inactivation, elle renforce aussi la sensibilité des microorganismes vis-à-vis des variations d'intensité du stress. Par exemple, la vitesse d'inactivation de *Salmonella* peut être multipliée par 10 suite à une acidification de 1,8 unités pH à 10°C, ou de seulement 1,2 à 20°C (Skandamis *et al.*, 2002). L'augmentation de la sensibilité à l'activité de l'eau est également observée par élévation de la température (Hajmeer *et al.*, 2006). Pour les activités de l'eau inférieures à 0,90, la sensibilité est multipliée par 4 à 6, à 30°C. Pour les activités de l'eau plus élevées, l'augmentation de température provoque une hausse de 20% de la sensibilité.



Figure 10 Influence de la température sur la durée nécessaire à la première réduction décimale (D) de <u>Listeria monocytogenes</u> CA et V7 pour un stress en bouillon tryptose additionné de 0,3% ( $\circ$ ) et 0,5% ( $\Box$ ) d'acide acétique, de 0,3% ( $\times$ ) et 0,5% (+) d'acide citrique ou de 0,3% ( $\diamond$ ) et 0,5% ( $\triangleleft$ ) d'acide lactique (d'après Ahamad et Marth, 1989).

Genre espèce	Variation de température	Taux de multiplication de la vitesse d'inactivation	milieu	Réf.
	4 à 20°C	10	yaourt	[1]
	4 à 8°C	2	2 yaourt	
	4 à 20°C	2	Amidon de pomme de terre	[3]
F coli	5 à 30°C	3	Mayonnaise	[4]
E. con	5 à 37°C	5	Fèces de bovin	[5]
	7 à 25°C	2	Jus de mangue	[6]
	7 à 25°C	2	Jus d'asperge	[6]
	7 à 25°C	2	yaourt	[6]
	10 à 40°C	10	Mayonnaise	[7]
	13 à 35°C	10	Bouillon tryptose (a), (b)	[8]
	13 à 35°C	6	Bouillon tryptose (c)	[8]
L. monocytogenes	4 à 24°C	2	Fraise fraîche	[9]
	4 à 37°C	10	Bouillon cœur cervelle (d)	[10]
	4 à 37°C	10	Bouillon tryptone soja <sup>(e)</sup>	
	5 à 21,1°C	4	Salade de poulet	[12]
C	5 à 20°C	4	Salade tarama	[13]
S. entertitals	5 à 20°C	10	Salade tarama	[14]
Salmonella spp.	15 à 30°C	4	Plat à base de poisson	[15]
	25 à 30°C	4	Chorizo	[16]
S. flexneri	4 à 37°C	10	Bouillon cœur cervelle <sup>(f)</sup>	[17]
Y. enterocolitica	<i>ca</i> 0,6 à 23,5°C 10 yaourt		[18]	
[1] (Bachrouri <i>et al.</i> , 1995) ; [5] (Wang <i>et</i> Marth, 1989) ; [9] (F (Guentert <i>et al.</i> , 2003	2006) ; [2] (Bachro al., 1996) ; [6] (Hs lessa <i>et al.</i> , 2005) ; b) ; [13] (Koutsoum	ouri <i>et al.</i> , 2002) ; [3] (Park et E in-Yi et Chou, 2001) ; [7] (Mer [10] (Buchanan <i>et al.</i> , 1994) ; [ nanis <i>et al.</i> , 1999) ; [14] (Skand	Beuchat, 2000) ; [4] (Hathcox <i>et</i> nbre <i>et al.</i> , 1997b) ; [8] (Ahama [11] (Shahamat <i>et al.</i> , 1980) ; [1 amis <i>et al.</i> , 2002) ; [15] (Sperbe	<i>t al.</i> , ad et [2] er,

Tableau 3 Influence de la température sur la vitesse d'inactivation.

[1] (Bachrouri *et al.*, 2006) ; [2] (Bachrouri *et al.*, 2002) ; [3] (Park et Beuchat, 2000) ; [4] (Hathcox *et al.*, 1995) ; [5] (Wang *et al.*, 1996) ; [6] (Hsin-Yi et Chou, 2001) ; [7] (Membre *et al.*, 1997b) ; [8] (Ahamad et Marth, 1989) ; [9] (Flessa *et al.*, 2005) ; [10] (Buchanan *et al.*, 1994) ; [11] (Shahamat *et al.*, 1980) ; [12] (Guentert *et al.*, 2003) ; [13] (Koutsoumanis *et al.*, 1999) ; [14] (Skandamis *et al.*, 2002) ; [15] (Sperber, 1983) ; [16] (Hajmeer *et al.*, 2006; [17] (Zaika et Phillips, 2005) ; [18] (Little *et al.*, 1994) (a) : additionné de 0,3M d'acide acétique ; (b) : additionné de 0,3M d'acide lactique ; (c) : additionné de 0,3M d'acide citrique ; (d) additionné de 2% acide lactique ; (e) : additionné de 15,5% ou 20,5% ou 25,5% NaCl ; (f) : à pH= 2 ou 3 ou 4

# 2. Modélisation du stress non thermique

De nombreux articles ou ouvrages présentent la Microbiologie prévisionnelle avec ses différentes approches. Parmi les plus récents citons le livre « Modelling microbial responses in food » édité par Mckellar et Lu en 2003 et les articles de Valdramidis *et al.* (2004) et de McMeekin *et al.* (2002). En Microbiologie prévisionnelle, la démarche modélisatrice se décompose généralement en trois étages (Whiting et Buchanan, 1993). La modélisation primaire décrit l'évolution d'une population bactérienne en fonction du temps. La modélisation secondaire décrit l'évolution des paramètres primaires en fonction de facteurs environnementaux (par exemple le pH de l'aliment) ou de facteurs propres aux cellules bactériennes (par exemple leur état physiologique). La modélisation tertiaire est alors la combinaison des modèles primaire et secondaire dans un logiciel permettant, par exemple, de calculer l'évolution d'une population bactérienne en fonction de facteurs environnementaux.

# 2.1 <u>Modélisation des courbes de survie : modélisation primaire</u>

La modélisation des courbes de survie liées à un traitement thermique est utilisée depuis le début du vingtième siècle afin de quantifier et d'optimiser l'impact des conditions de traitement. Le modèle log-linéaire (cinétique d'ordre 1) est traditionnellement appliqué pour décrire l'inactivation thermique de populations bactériennes (Chick, 1908). Dans ce cas, la courbe de survie est donc décrite par :

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-kt}$$
 Équation 1

Où *N* représente l'effectif de la population survivante au temps t,  $N_0$  est l'effectif de la population au début de l'application du stress (t = 0), et k est le taux de destruction.

L'expression usuelle de ce modèle est celle en logarithme décimal, ou le taux de destruction k cède sa place à un paramètre plus facilement interprétable qui est la durée de réduction décimale (D):

$$N(t) = N_0 \cdot 10^{-\frac{t}{D}} \qquad \text{équation 2}$$

La réduction des courbes de survie au comportement log-linéaire a l'avantage de la simplicité d'utilisation et d'interprétation. Cette vision simpliste des cinétiques d'inactivation s'est répandue universellement, et a été appliquée à l'optimisation des barèmes de stérilisation ou de pasteurisation. Mais l'emploi abusif de ce modèle peut conduire à des erreurs d'optimisation si l'inactivation de la population cible dévie trop de la log-linéarité.

# 2.1.1. La cinétique d'ordre un : un cas particulier

Les courbes log-linéaires de survie sont en fait un cas particulier des courbes de survie. Concave, convexe, sigmoïdale, biphasique ou simple destruction log-linéaire, une même espèce bactérienne présente différentes formes de courbes en fonction des conditions expérimentales, que l'on fasse référence aux conditions de stress ou aux conditions de préparation de l'inoculum (figure 1). De nombreux modèles ont été développés pour décrire un ou plusieurs types de courbes de survie. Dans le cas du traitement thermique de populations microbiennes et particulièrement dans le cas de spores bactériennes, les allures des courbes de survie peuvent être relativement indépendantes des facteurs environnementaux sans pour autant être linéaires (Peleg et Cole, 1998; Peleg et Penchina, 2000; Fernandez *et al.*,

2002; Mafart *et al.*, 2002; van Boekel, 2002; Couvert *et al.*, 2005). Dans ce cas, un modèle permettant de décrire un seul type de courbe peut être appliqué. Mais le problème est plus difficile à résoudre si l'allure des courbes d'inactivation varie en fonction de l'intensité du stress appliqué. Dans le cadre de traitement thermique, il s'agit le plus fréquemment de traitements à faible température et de cellules végétatives (Geeraerd *et al.*, 2000).



Figure 1 Différentes formes de courbes d'inactivation : biphasique avec épaulement (a), sigmoïdale (b), convexe (c), linéaire (d), concave (e), biphasique (f), linéaire avec traînée (g)

Dans le cadre de l'inactivation non thermique, le phénomène de non linéarité des courbes de survie est amplifié, et il est ainsi rare de trouver une courbe de survie log-linéaire. Comme nous l'avons vu précédemment l'intensité du stress, mais aussi l'adaptation des cellules, jouent sur l'allure des courbes de survie (cf. paragraphe 1.1.2). La non linéarité des courbes de survie s'explique par la différence de résistance et de capacité d'adaptation au stress entre les individus. Elle est liée à la variation génétique entre les individus, l'hétérogénéité de la transcription, du suivi des protéines, de la protéolyse (Booth, 2002; Brehm-Stecher et Johnson, 2004).

Deux théories s'opposent pour expliquer la non linéarité des courbes de survie : la théorie vitaliste et la théorie mécaniste (Lee et Gilbert, 1918; Cerf, 1977; Geeraerd *et al.*, 2000; Heldman et Newsome, 2003; Valdramidis *et al.*, 2004). Selon les deux théories, l'épaulement et la traînée qui peuvent être observés sur les courbes de survies, sont dus à une hétérogénéité de la résistance au stress.

Selon la théorie vitaliste, la résistance au stress est un caractère intrinsèque à l'individu et cette résistance est variable selon les individus. La non linéarité des courbes de survie est donc un phénomène tout à fait normal, lié par exemple à la plus ou moins grande résistance d'une molécule critique. Par contre selon la théorie mécaniste, l'hétérogénéité est due à des facteurs extrinsèques à la cellule bactérienne. Cerf (1977) classe les origines de ces facteurs en trois catégories. Premièrement, la traînée est un phénomène normal lié aux mécanismes provoquant l'inactivation. Par exemple, une molécule critique possèderait trois états (sensible, résistant et inactivé). Et le passage d'un état à l'autre expliquerait les courbes sigmoïdales de survie et les concaves. Deuxièmement, la traînée est un phénomène lié aux mécanismes de résistance (modification de la résistance pendant le traitement). Et troisièmement, la traînée est un phénomène indépendant des mécanismes d'inactivation. Elle peut être le fruit de l'hétérogénéité génétique, de l'hétérogénéité du traitement, la présence d'agrégats cellulaires, des méthodes de dénombrement. La construction des modèles peut s'effectuer selon deux approches. L'approche empirique et l'approche mécaniste. Les modèles empiriques décrivent simplement les données sans prendre en compte les phénomènes provoquant la réponse observée. Les modèles mécanistes sont développés à partir de théories, d'hypothèses et permettent d'expliquer la réponse à modéliser par l'action de phénomènes physiques, biologiques et/ou chimiques. L'avantage d'une approche mécaniste est d'avoir des bases plus solides pour d'éventuels développements ou expansions du modèle (Ross et Dalgaard, 2003). En Microbiologie prévisionnelle, la grande majorité des modèles ne sont pas purement empiriques ou purement mécanistes. Nous utiliserons le terme « mécaniste » par opposition au terme « empirique ».

De nombreux modèles ont été employés pour décrire l'inactivation due à un stress non thermique. Le plus souvent, il s'agit de modèles antérieurement proposés dans le cadre de traitement thermique et dont les applications ont été élargies aux autres stress. Mais certains modèles ont été spécialement développés pour l'inactivation non thermique (Buchanan et al., 1993; Whiting, 1993; Membre et al., 1997b; Breand, 1998; Xiong et al., 1999). Tous les modèles ont été confrontés et critiqués en fonction des théories ou des hypothèses sur lesquelles ils reposent, mais aussi en fonction de leur parcimonie, de leur performance d'ajustement, de l'interprétation physique, chimique ou biologique de leurs paramètres, de leur capacité à décrire les différentes formes de courbes de survie, de leur capacité à être utilisé sous forme dynamique et donc à décrire le comportement microbien en conditions environnementales variables (Cerf, 1977; Xiong et al., 1999; Geeraerd et al., 2000; Valdramidis et al., 2004; Albert et Mafart, 2005). Dans le cadre de cette étude, le propos n'est donc pas de comparer tous les modèles permettant de décrire une courbe de survie non loglinéaire, mais, simplement de présenter les différentes démarches et les modèles qui ont été appliqués dans le cadre de l'inactivation non thermique avec leurs qualités et défauts. Nous distinguerons deux catégories de modèles : les modèles empiriques d'ajustement regroupant les modèles vitalistes ou des modèles empiriques, et des modèles obtenus à partir d'une approche plus mécaniste.

# 2.1.2. Modèles empiriques d'ajustement

### <u>Les modèles vitalistes</u>

Plusieurs travaux ont adopté l'approche vitaliste pour modéliser l'inactivation d'une population bactérienne en aliment en fonction du temps et des facteurs environnementaux. Basés sur le modèle proposé par Cole *et al.* (1993), ces travaux proposent de modéliser l'inactivation de *Yersinia enterocolitica* en yaourt et en mayonnaise (Little *et al.*, 1994), de *Salmonella enteritidis* en salade grecque (Skandamis *et al.*, 2002), ou de *Listeria monocytogenes* en bouillon d'enrichissement additionné de phénols et de chlorure de sodium (Membre *et al.*, 1997a). Les prédictions de ces modèles sont tout à fait satisfaisantes et plus performantes que d'autres modélisations comme celle proposées par le logiciel « Pathogen Modelling Program » (Skandamis *et al.*, 2002). Cette modélisation permet de décrire des courbes de survie de forme log-linéaire, log-linéaire avec un épaulement et/ou une traînée. Il ne permet pas de décrire les courbes de survie biphasique avec ou sans épaulement. Comparant les différents modèles permettant de décrire les courbes sigmoïdales de survie, Geeraerd *et al.* (2000) n'incluent pas ce modèle dans leur étude. Les auteurs invoquent le fait que le modèle log-logistique proposé par Cole *et al.* (1993) est de nature symétrique, ce qui n'est pas compatible avec les données observées.

### Les modèles combinés décrivant la croissance et l'inactivation

Certains modèles décrivent le comportement des microorganismes dans sa globalité comprenant à la fois la croissance et l'inactivation (Ross *et al.*, 2005). La modélisation de l'inactivation repose alors sur l'approche log-linéaire dans un environnement qui varie en fonction du temps. Le taux de mortalité des cellules bactériennes est alors supposé être directement proportionnel à la concentration en agents létaux ou inversement proportionnelle à la concentration en agents létaux ou inversement proportionnelle à la concentration de l'estomac (Takumi *et al.*, 2000), production de bactériocine par une flore d'intérêt (Leroy et de Vuyst, 1999; Leroy *et al.*, 2005), la variation de la concentration en protons, acide faible sous forme non dissociée, en glucose et saccharose (Skandamis et Nychas, 2003). Ces modèles décrivent convenablement l'inactivation dans ces conditions spécifiques, mais ils ne peuvent pas être appliqués sur des courbes non linéaires de survie en condition constante.

Le modèle de Churchill et Usagi (1972) est très utilisé dans l'industrie chimique. Il permet de décrire à la fois la croissance et l'inactivation d'un microorganisme et a été appliqué à *Listeria monocytogenes* en bouillon d'enrichissement (Membre *et al.*, 1997a). Ce modèle décrit convenablement l'évolution de la population bactérienne. Néanmoins, ces paramètres sont difficilement interprétables d'un point de vue biologique. De plus, la taille de l'inoculum, les vitesses de croissance et de destruction sont étroitement liées. Enfin, le module permettant de décrire l'inactivation bactérienne est un modèle de type inverse d'exponentiel. De ce fait, il permet de décrire uniquement des courbes concaves de survie.

#### Le modèle de Gompertz

Le modèle de Gompertz a été utilisé pour décrire l'inactivation de *Listeria* monocytogenes en bouillon d'enrichissement (Membre *et al.*, 1997a), et celle de Salmonella enteritidis en salade grecque (Koutsoumanis *et al.*, 1999). Bien que ce modèle s'ajuste convenablement sur les courbes d'inactivation bactérienne, le paramètre ( $N_0$ ) n'est pas égal à l'effectif initial de la population. Les autres paramètres n'ont pas plus de signification biologique. De plus sous la forme différentielle, ce modèle n'est pas indépendant du paramètre  $N_0$  ce qui permet plus difficilement son utilisation pour décrire le comportement microbien en conditions environnementales variables (Geeraerd *et al.*, 2000).

#### Le modèle de Membré et al. (1997b)

Membré et al. (1997b) ont proposé un modèle exponentiel pour décrire l'inactivation de *Salmonella typhimurium* en mayonnaise. Ce modèle est de la forme :

$$\log_{10}(N(t)) = (1 + \log_{10}(N_0)) - e^{k.t}$$
 Équation 3

Le paramètre k permet de renseigner sur la vitesse d'inactivation (plus il est faible, plus la vitesse est faible). L'avantage de ce modèle est de comporter uniquement deux paramètres. Mais il peut s'appliquer uniquement aux courbes convexes de survie. De plus, la dérivée de ce modèle par rapport au temps est dépendante de  $N_0$  (Valdramidis *et al.*, 2004).

#### Le modèle tri linéaire

Le modèle de Buchanan *et al.* (1993) a été appliqué afin de décrire l'inactivation de *Listeria monocytogenes* en bouillon cœur cervelle (Buchanan *et al.*, 1993; Buchanan *et al.*, 1994; Buchanan et Golden, 1994; Buchanan *et al.*, 1997; Buchanan et Golden, 1998). Ce modèle linéaire segmenté prend en compte l'épaulement et la phase de destruction de la population. Bréand (1998) a étendu ce modèle à la description de la traînée pour Escherichia coli en bouillon trypticase soja :

$$\log_{10}(N(t)) = \begin{cases} \log_{10}(N_0) + k_0 t & si & t \le t_{lag} \\ \log_{10}(N_0) + k_0 t_{lag} + k (t - t_{lag}) & si & t_{lag} < t \le t_{max} \\ \log_{10}(N_0) + k_0 t_{lag} + k (t_{max} - t_{lag}) & si & t_{max} < t \end{cases}$$
 Équation 4

Ce modèle comporte cinq paramètres :  $N_0$  l'effectif initial de la population,  $k_0$  le taux initial de mortalité,  $t_{lag}$  le temps de latence pendant lequel la vitesse de mortalité est faible, kle taux maximal de mortalité,  $t_{max}$  le temps à partir duquel le traitement n'a plus d'effet sur la population, son effectif est alors constant. Ce modèle décrit une inactivation sigmoïdale (figure 2) avec  $k_I \neq 0$  (a.1) ou  $k_I = 0$  (a.2); log-linéaire avec un épaulement (b); log-linéaire avec une traînée (c). Il ne permet pas de décrire les courbes de type biphasique ou concave. Et il n'est pas différentiable en raison de sa nature segmentée.



Figure 2 Allures des courbes de survie décrites par le modèle étendu de Buchanan. Allure sigmoïdale (a.1, a.2), linéaire avec épaulement (b), linéaire avec traîné (c).

### 2.1.3. Modèles basés sur la distribution de Weibull

La distribution de Weibull est l'une des distributions les plus répandues pour la description de la durée de vie de pièces mécaniques par exemple. En Microbiologie, cette distribution de la durée de vie a été d'abord employée pour décrire l'inactivation bactérienne due à stress thermique (Peleg et Cole, 1998; Fernandez *et al.*, 1999). Selon ces travaux, la distribution de la résistance au stress au sein de la population bactérienne suit une distribution de Weibull. L'évolution de la population durant l'application d'un stress peut être alors décrite par :

$$\frac{N(t)}{N_0} = e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta}}$$
 Équation 5

Dans ce cas,  $\alpha$  est un paramètre d'échelle, plus  $\alpha$  est grand, plus la durée de vie des individus est longue, et  $\beta$  est un paramètre de forme. Mais ce n'est pas la variation de l'effectif de la population par rapport à l'effectif initial qui est observée et mesurée par les microbiologistes, mais le nombre de survivants en fonction du temps. L'équation permettant de décrire la courbe de survie de la population bactérienne est alors :

$$N(t) = N_0 \cdot e^{-\left(\frac{t}{\alpha}\right)^{\beta}}$$
 Équation 6

En passant en base décimale, Mafart et al. 2002 ont reparamétré cette équation en :

$$N(t) = N_0 \cdot 10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p}$$
 Équation 7

Avec :  $\delta$  le temps nécessaire à la première réduction décimale, et p paramètre sans dimension qui n'est autre que le paramètre  $\beta$  sous une autre notation et qui décrit donc la forme de la courbe de survie. En fonction de la valeur de ces paramètres, le modèle de Weibull permet de décrire différentes allures typiques des courbes de survie (figure 3). Si p ou  $\beta$  est inférieur à 1, la courbe de survie est concave (figure 3, c). Si p ou  $\beta$  est supérieur à 1, la courbe de survie est convexe (figure 3, b). Si p ou  $\beta$  est égal à 1, la courbe de survie est loglinéaire (figure 3, a). Dans ce dernier cas en base décimale, nous avons donc  $\delta$  qui correspond au paramètre D.

Le modèle de Weibull a été appliqué dans le cadre de l'inactivation non thermique sous ces deux différentes formes. Sous sa forme népérienne, il a été employé pour décrire l'inactivation de populations microbiennes soumises à un désinfectant volatil (Corradini et Peleg, 2003), et celle de Salmonella en chorizos (Hajmeer *et al.*, 2006). Sous sa forme décimale, il a permis de décrire l'inactivation de *Yersinia enterocolitica* soumise à stress acide (Virto *et al.*, 2005).

Par ailleurs, ce modèle a été très appliqué dans le cadre du traitement thermique (Heldman et Newsome, 2003). Une forte corrélation est observée entre le paramètre d'échelle ( $\delta$  ou  $\alpha$ ) et le paramètre de forme ( $\beta$  ou p) (Peleg et Penchina, 2000; Mafart *et al.*, 2002; Couvert *et al.*, 2005). De plus, le paramètre de forme varie peu en fonction des conditions environnementales et en particulier la température de traitement (Peleg et Penchina, 2000; Fernandez *et al.*, 2002; van Boekel, 2002; Couvert *et al.*, 2005). Ceci est confirmé dans le cadre de l'inactivation non thermique pas les travaux de Hajmeer (2006) qui trouve une valeur très proche ( $\beta \approx 0,3$ ) quelle que soit l'activité de l'eau des chorizos, la température et le flux d'air durant leur stockage. Par contre Virto *et al.* (2005) trouvent que la courbure (p) change

en fonction de la température d'inactivation, mais pas ou peu en fonction de la concentration en acide du milieu.

Dans certains cas, le paramètre de forme ( $\beta$  ou p) est donc considéré commun à toutes les cinétiques de survie quelles que soient les conditions de stress, ce qui permet d'obtenir seulement un paramètre ( $\delta$  ou  $\alpha$ ) à estimer en fonction des conditions d'inactivation. Cette simplification induit que l'épaulement est lié à la vitesse d'inactivation caractérisée par  $\delta$  ou  $\alpha$ . Ainsi, les modèles caractérisant l'épaulement et la vitesse par deux paramètres différents ( $t_{lag}$  et k par exemple) seraient surparamétrés dans certains cas pour décrire les cinétiques d'inactivation.



Figure 3 Allures des courbes de survie décrites par le modèle de Weibull et par sa forme modifiée (Albert et Mafart, 2005). (a) linéaire, (b) convexe, (c) concave, (d) linéaire avec traîné, (e) sigmoïdale.

Si le modèle de Weibull rend compte des allures linéaire, convexe et concave, il ne rend pas compte de l'allure biphasique ou sigmoïdale des courbes survie. Afin de pouvoir décrire une traîné en fin de cinétique, le modèle de Weibull sous sa forme reparamétrisée par Mafart *et al.* (2002), a été modifié par l'ajout d'une asymptote inférieure (correspondant aux long temps de traitement) (Albert et Mafart, 2005). Cette asymptote représente une fraction irréductible de la population par le stress appliqué. Le modèle s'écrit :

$$N(t) = (N_0 - N_{res}) 10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^{\nu}} + N_{res}$$
 Équation 8

Où  $N_{res}$  est la concentration résiduelle de microorganismes à la fin du traitement appliqué.

Ce modèle présente de nombreux avantages (Albert et Mafart, 2005), et il répond notamment aux différents critères requis pour décrire l'inactivation microbienne, énumérés par Geeraerd *et al.* (2000). Il est parcimonieux avec seulement 4 paramètres ( $N_0$ ,  $N_{res}$ ,  $\delta$ , p). Un modèle dynamique peut être formulé. Ces paramètres sont facilement interprétables notamment  $\delta$  qui est proche du paramètre D utilisé traditionnellement. Il permet de décrire un grand nombre de formes de courbes de survie (cf. figure 3), hormis les allures biphasiques avec épaulement.

### 2.1.4. Modèle de Geeraerd et al. (2000)

Comme nous l'avons déjà indiqué, Geeraerd et al. (2000) ont étudié et critiqué les modèles non linéaires permettant de décrire les courbes de survie non log-linéaire qui apparaissent souvent dans le cadre de traitements thermiques modérés. Ces auteurs proposent un nouveau modèle sous une forme dynamique, il est basé sur les deux équations suivantes :

$$\frac{dN}{dt} = -k_{\max} \cdot N \cdot \left(\frac{1}{1+C_c}\right) \cdot \left(1 - \frac{N_{res}}{N}\right)$$
Équation 9  
$$\frac{dC_c}{dt} = -k_{\max} \cdot C_c$$
Équation 10

*N* représente alors la concentration des microorganismes ;  $k_{max}$  le taux de mortalité ;  $N_{res}$  l'effectif résiduel de la population en fin de traitement ;  $C_c$  pourrait être lié à l'état physiologique des cellules, avec un épaulement plus ou moins long en fonction de leur capacité à résister au stress, et qui correspond à la « fonction d'ajustement » du modèle de croissance de Baranyi et Roberts (1994). En conditions statiques, le modèle peut s'écrire

$$N(t) = (N_0 - N_{res})e^{-k_{max}.t} \cdot \left(\frac{1 + C_c(0)}{1 + C_c(0)e^{-k_{max}.t}}\right) + N_{res}$$
 Équation 11

Avec  $C_c(0)$  lié à l'état physiologique initiale de la population.

Ce modèle permettrait donc de prendre en compte l'état physiologique de la population par l'intermédiaire de l'épaulement et du taux de mortalité.  $N_{res}$  peut être dépendant des conditions physiologiques ou de l'intensité du stress, puisqu'il représente une fraction de la population plus résistante. Greenacre *et al.* (2003) étudie l'adaptation au stress acide de *Salmonella enterica* et *Listeria monocytogenes*. L'exposition à des pH modérés est effectuée pendant 1 à 6 heures. Le milieu d'adaptation est acidifié à pH 5,0, 5,5 et 5,8 selon le microorganisme, avec de l'acide acétique ou de l'acide lactique. La période d'adaptation est suivie par un stress acide de pH=3,0 (HCl) en bouillon trypticase soja additionné de glucose (1%). Pour caractériser l'adaptation des microorganismes, les auteurs utilisent le temps d'épaulement ou temps de latence à la mortalité ( $t_{lag}$ ), et le temps nécessaire pour arriver en début de traînée ( $t_{res}$ ) :

$$t_{lag} = \frac{\ln(C_c(0))}{k_{max}}$$
Équation 12  
$$t_{res} = t_s + \frac{\ln\left(\frac{N_0}{N_{res}}\right)}{k_{max}}$$
Équation 13

Malgré tout, l'évolution des différents paramètres n'a pas été étudiée complètement en fonction des conditions d'adaptation. En effet, les auteurs ont ajusté le modèle de Geeraerd *et al.* (2000) avec  $N_{res}$  égale à 0, pensant que l'adaptation au stress ne joue que sur l'épaulement et le taux de mortalité. De plus, comme l'effectif de la sous-population résiduelle est faible et que l'erreur des dénombrements aux faibles concentrations est élevée, ils considèrent qu'ils ne peuvent pas travailler avec le paramètre  $N_{res}$ . Avec cette simplification, ils concluent que ce modèle n'est pas adapté pour décrire l'adaptation au stress acide de *Salmonella enterica* et de *Listeria monocytogenes*.

Le modèle de Geeraerd *et al.* (2000) a été modifié par ses auteurs afin d'introduire un temps de latence à l'épaulement à la place du paramètre  $C_c(0)$  (Geeraerd *et al.*, 2005). Ils posent :

$$C_c(0) = e^{k_{\max} \cdot t_{lag}}$$
 Équation 14

Avec  $t_{lag}$  durée de l'épaulement équivalent au temps de latence à la mortalité.

Le modèle devient donc :

$$N(t) = (N_0 - N_{res})e^{-k_{max} \cdot t} \cdot \left(\frac{e^{k_{max} \cdot t_{lag}}}{1 + (e^{k_{max} \cdot t_{lag}} - 1)e^{-k_{max} \cdot t}}\right) + N_{res}$$
 Équation 15

Ce modèle a été utilisé pour décrire l'inactivation de *Listeria innocua* en bouillon cœur cervelle additionné d'acide lactique (Janssen *et al.*, 2004; Janssen *et al.*, 2005). Il s'ajuste correctement aux courbes expérimentales. De plus, il renseigne sur la vitesse d'inactivation par l'intermédiaire des paramètres  $k_{max}$  et  $t_{lag}$ . Le premier augmente avec l'augmentation de la concentration en acide lactique ou la diminution du pH et le second diminue avec l'augmentation de la concentration en acide lactique ou la diminution du pH. La traînée n'est pas observée sur l'ensemble des données, mais ponctuellement sans relation semble-t'il avec le pH ou la concentration en acide du milieu d'inactivation. En effet, sur 7 courbes de survie à pH=6,20 et de concentration totale en acide lactique 0,0379 M, 0,0485 M, 0,0526 M, 0,0637 M, 0,0738 M, 0,0816 M, 0,0963 M, 0,1047 M, seule une courbe (0,0485 M) présente une traînée.



*Figure 4 Allures des courbes de survie décrite pas le modèle de Geeraerd et al. (2000; 2005).* (*a) log-linéaire, (b) log-linéaire avec traîné, (c) log-linéaire avec épaulement, (d) sigmoïdale.* 

Geeraerd *et al.* (2000) remarquent que, sous la forme dynamique, leur modèle est une reparamétrisation du modèle de Baranyi et Roberts (1994) proposé pour la croissance et du modèle de Whiting (1993) sous sa forme sigmoïdale ( $k_2$ =0) (1993). Il est à noter que le modèle de Baranyi et Roberts (1994) a été utilisé pour décrire l'inactivation de *Salmonella enteritidis* en salade grecque (Koutsoumanis *et al.*, 1999). Ce modèle permet une meilleure description des courbes de survie que le modèle de Gompertz (Koutsoumanis *et al.*, 1999).

Le modèle de Geeraerd *et al.* (2000; 2005) comporte de nombreux avantages. Le modèle est suffisamment flexible pour décrire les allures de courbes sigmoïdales dans le cas général, log-linéaire si  $N_{res}$ =0 et  $C_c$  ou  $t_{lag}$ =0; log-linéaire avec traînée si  $N_{res}$ >0 et  $C_c$  ou  $t_{lag}$ =0; convexe avec  $N_{res}$ =0 et  $C_c$  ou  $t_{lag}$ >0. Il peut s'écrire sous forme dynamique indépendante des conditions initiales de traitement ( $N_0$  et  $t_0$ ), ce qui facilite son utilisation en conditions variables. De plus, ses différents paramètres peuvent être facilement interprétés, notamment sous la forme proposée en 2005 (équation 15). Par contre, il ne permet pas de décrire les courbes concaves ou biphasiques avec épaulement.

### 2.1.5. Modèles basés sur l'existence de deux sous-populations

#### Le modèle de Cerf (1977)

Le modèle proposé par Cerf (1977) a été utilisé pour décrire l'inactivation thermique bactérienne. Néanmoins il trouve sa place dans ce chapitre puisque plusieurs modèles découlent de l'approche adoptée pour développer ce modèle. En effet, ce modèle repose sur l'existence de deux fractions de résistances différentes au stress au sein de la population. L'inactivation de chaque sous-population suit une courbe de survie décrite par un modèle d'ordre un. Il peut s'écrire :

$$N(t) = N_0 (f \cdot e^{-k_1 \cdot t} + (1 - f) \cdot e^{-k_2 \cdot t}) \quad \text{Équation 16}$$

où f est la proportion au sein de la population totale de la population majoritaire,  $k_1$  le taux de destruction de cette sous population et  $k_2$  le taux de destruction de la population minoritaire. Ce modèle permet uniquement de décrire des allures biphasiques.

#### Le modèle de Xiong et al. (1999)

Dérivé du modèle de Cerf (1977), le modèle de Xiong *et al.* (1999) a été établi sur les courbes de survie de *Staphylococcus aureus* en bouillon cœur cervelle (Whiting *et al.*, 1996). Ce modèle inclut un temps de latence à la mortalité. Le modèle de Xiong *et al.* (1999) peut s'écrire :

$$N(t) = \begin{cases} N_0 & si \quad t \le t_{lag} \\ N_0 \left( f \cdot e^{-k_1 \cdot (t - t_{lag})} + (1 - f) \cdot e^{-k_2 \cdot (t - t_{lag})} \right) & si \quad t > t_{lag} \end{cases}$$
 Équation 17

Pour des raisons simplificatrices, Xiong *et al.* (1999) considère le temps de latence  $(t_{lag})$  commun aux deux sous populations. Pour les temps inférieurs à  $t_{lag}$ , l'effectif de la population est constant et égal à l'effectif initial  $N_0$ . A partir de l'instant  $t_{lag}$ , la population décroît. La proportion de la population la plus sensible, noté f, décroît à la vitesse  $k_1$ . Le taux de mortalité de la population la plus résistante est noté  $k_2$ . Bien que ce modèle décrive l'ensemble des allures des courbe de survie, il est segmenté et donc pas différenciable par rapport au temps.



Figure 5 Allures des courbes de survie décrites par le modèle Xiong et al.(1999) (a) linéaire, (b) biphasique, (c) linéaire avec épaulement, (d) biphasique avec épaulement, (e) sigmoïdale.

#### Le modèle de Whiting (1993)

Le modèle de Whiting (1993) est dérivé du modèle proposé par Kamau *et al.* (1990) basé sur le modèle logistique. Il a été proposé pour décrire l'inactivation non thermique de *Salmonella, Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* en bouillon cœur cervelle (Whiting, 1993; Buchanan *et al.*, 1994; Whiting *et al.*, 1996). Dérivé du modèle logistique, il repose sur la coexistence de deux sous populations de résistances différentes au stress. Il peut s'écrire sous la forme (Whiting *et al.*, 1996) :

$$N(t) = N_0 \left( \frac{f \cdot (1 + e^{-k_1 \cdot t_{lag}})}{1 + e^{k_1 \cdot (t - t_{lag})}} + \frac{(1 - f) \cdot (1 + e^{-k_2 \cdot t_{lag}})}{1 + e^{k_2 \cdot (t - t_{lag})}} \right)$$
 Équation 18

Avec :  $N_0$  : l'effectif initial de la population

 $t_{lag}$ : temps de latence à la mortalité

f: la proportion de la population majoritaire dans la population totale

 $k_1$ : le taux de mortalité maximum spécifique de la population majoritaire

 $k_2$ : le taux de mortalité maximum spécifique de la population minoritaire

L'avantage du modèle de Whiting (1993) est d'être flexible car il permet de décrire un grand nombre d'allures typiques des courbes de survie suivant les valeurs prises par ses paramètres (Geeraerd *et al.*, 2000). Le cas général est décrit par l'équation ci-dessus avec f < 1,  $t_{lag} \neq 0$ ,  $k_1 \neq 0$ , et  $k_2 \neq 0$ , l'allure de la courbe est biphasique avec épaulement (figure 6, (e)). Nous pouvons citer quelques formes particulières caractéristiques :

Si f=1 et  $t_{lag}=0$  alors :

$$N(t) = N_0 \frac{2}{1 + e^{k_1 \cdot t}}$$

Dans ce cas la courbe de survie est très proche d'une destruction log-linéaire (Figure , (a)). Mais, cette équation ne peut pas se simplifier en une équation linéaire (Whiting, 1993).

Si  $f_l = 1$  et  $t_{lag} \neq 0$  alors :  $N(t) = N_0 \frac{1 + e^{-k_1 \cdot t_{lag}}}{1 + e^{k_1 \cdot (t - t_{lag})}}$ 

Le modèle décrit alors une courbe de survie log-linéaire précédée d'un épaulement (figure 6, (b)).

$$\operatorname{Si} f_l < 1$$
 et  $t_{lag} = 0$  alors :

$$N(t) = N_0 \left( \frac{2f_1}{1 + e^{k_1 \cdot t}} + \frac{2(1 - f_1)}{1 + e^{k_2 \cdot t}} \right)$$

La courbe de survie est alors biphasique (figure 6, (c)).

Si  $f_1 < 1$ ,  $t_{lag} \neq 0$  et k<sub>2</sub>=0 alors :  $N(t) = N_0 \left( \frac{f_1 \cdot (1 + e^{-k_1 \cdot t_{lag}})}{1 + e^{k_1 \cdot (t - t_{lag})}} + (1 - f_1) \right)$ 

La courbe de survie est alors sigmoïdale (figure 6, (d)).



Figure 6 Allures des courbes de survie décrites par le modèle de Whiting 1993, (a) linéaire, (b) linéaire avec épaulement, (c) biphasique, (d) sigmoïdale), (e) biphasique avec épaulement.

L'ensemble des paramètres du modèle de Whiting (1993) est à peu près interprétable et de dimension simple. Nous pouvons néanmoins noter que la valeur du paramètre  $t_{lag}$  ne correspond pas tout à fait au temps à partir duquel la population décroît. Par exemple, figure 6, la valeur de  $t_{lag}$  est de 30 alors que la valeur du temps de latence qui peut être estimé visuellement semble inférieure, proche de 25. Ce modèle peut s'écrire sous une forme dynamique mais elle est dépendante de  $N_0$  ce qui ne facilite pas son usage en conditions dynamiques.

# 2.2. <u>Modélisation de l'influence de l'environnement sur la vitesse</u> <u>d'inactivation : modélisation secondaire</u>

Dans le cadre de la croissance bactérienne, la totalité des paramètres primaires (par exemple : le taux de croissance et le temps de latence) sont modélisés en fonction des conditions environnementales. Par contre, pour l'inactivation non thermique, les auteurs n'utilisent pas totalement la paramétrisation de leur modèle primaire, mais à partir de celle-ci, ils déduisent le temps nécessaire pour diminuer l'effectif de la population d'une certaine proportion. Ainsi, un indice apparaît : le  $t_{nD}$ , calculé à partir de l'estimation des paramètres primaires. Cet indice permet de rendre compte du temps nécessaire pour arriver à n réductions décimales. En général, les auteurs envisagent une, deux ou quatre réductions décimales, l'indice s'appelle donc logiquement les  $t_D$ ,  $t_{2D}$ ,  $t_{4D}$ . Mais ce paramètre ne renseigne en rien sur l'évolution de l'allure des courbes de survie. Imaginons que deux courbes de survie obtenues dans différentes conditions environnementales permettent d'obtenir la même valeur de  $t_{4D}$ . La première étant concave et la seconde convexe, les temps nécessaires à 1 ou 2 réductions décimales sont complètements différents. Néanmoins le  $t_{nD}$  a l'avantage de refléter la vitesse à laquelle les cinétiques évoluent et de permettre une modélisation pseudo secondaire d'un seul paramètre. En effet, il faudrait réaliser pour chaque paramètre primaire cette modélisation, et les modèles les plus parcimonieux comportent 3 paramètres.

Pour des stress non thermiques, la modélisation secondaire est restreinte à quelques travaux. Nous ne traiterons pas de la modélisation vitaliste qui est effectuée en une seule étape, intégrant les facteurs environnementaux au même niveau que le temps (cf. paragraphe 2.1.2). En microbiologie prévisionnelle, les modèles polynomiaux sont majoritaires. Dans le cadre de l'inactivation non thermique, seulement cinq travaux proposent des modèles pouvant se distinguer de l'approche polynomiale.

# 2.2.1. Modélisation polynomiale

Les modèles polynomiaux permettent de rendre compte de l'influence simultanée de nombreux facteurs en prenant en compte leurs interactions (tableau 1). Ils sont faciles d'utilisation, puisque leur ajustement consiste en une simple régression linéaire multiple, permettant de plus une estimation très simple des intervalles de confiance des paramètres. Ils peuvent être très utiles dans le cadre d'une optimisation de composition d'un milieu ou d'un aliment. Buchanan *et al.* (1994) adoptent cette approche pour décrire l'influence de la température, du pH, de la concentration en acide lactique, de la concentration en chlorure de sodium et la concentration en nitrite de sodium sur la vitesse d'inactivation de *Listeria monocytogenes*. Ce modèle est le suivant :

 $\begin{aligned} &\ln(t_{4D}) = 7,2946 + 0,1566.T + 0,237.S - 3,2522.L + 0,000749.N - 0,00976.T.S \\ &- 0,0213.T.L - 0,000397.T.N - 0,1061.S.L - 0,000595.S.N - 0,0509.L.N \\ &- 0,00671.T^2 - 0,0178.S^2 + 1,9463.L^2 - 0,0000198.N^2 - 0,00257.T.S.L \\ &- 0,00000105.T.S.N + 0,000185.T.L.N - 0,0000228.S.L.N + 0,0000442.T.S^2 \\ &+ 0,00000145.T.N^2 + 0,0108.T.L^2 + 0,000222.T^2.S + 0,00000134.T^2.N \\ &+ 0,000209.T^2.L + 0,0459.S.L^2 + 0,00000224.S.N^2 + 0,00264.S^2.L \\ &- 0,000000448.S^2.N + 0,0000669.L.N^2 + 0,0141.L^2.N + 0,0000344.T^3 \\ &+ 0,000364.S^3 - 0,7234.L^3 - 0,000000026.N^3 + 0,0000318.T.S.L.N \end{aligned}$ 

Avec T la température, S la concentration en chlorure de sodium, L la concentration en acide lactique, et N la concentration en nitrite de sodium.

Ce type d'équation est généralement simplifié en conservant les termes statistiquement significatifs. Dans les travaux de Buchanan *et al.* (1994), cette simplification permet de passer de 36 à 12 paramètres pour décrire l'influence de 4 facteurs :

$$ln(t_{4D}) = 0.9354 + 0.052.T - 5.7174.L - 0.0108.T.S - 0.0511.L.N$$
  
-0.00401.T<sup>2</sup> + 3.6059.L<sup>2</sup> + 0.0000835.L.N<sup>2</sup> + 0.000219.T<sup>2</sup>.S Équation 20  
+ 0.0136.L<sup>2</sup>.N - 1.0113.L<sup>3</sup> + 0.0000318.T.S.L.N

Outre leur aspect inesthétique, les modèles polynomiaux à l'image de l'équation 19 comportent un grand nombre de paramètres et manquent donc de parcimonie. Même si l'élimination des coefficients non significatifs permet d'obtenir un modèle plus parcimonieux, les différents coefficients sont difficilement interprétables.

De plus le domaine d'utilisation de ces modèles est plus restreint que l'espace multidimensionnel défini par les bornes des gammes étudiées des différents facteurs (Baranyi *et al.*, 1996; Le Marc *et al.*, 2005). Ces modèles sont très, et même, trop flexibles et s'ils sont utilisés en dehors de la plage d'interpolation, ils peuvent conduire à des estimations aberrantes. Par exemple, Geeraerd *et al.* (2004) remarque que le modèle proposé par Buchanan *et al.* (1997) induit une augmentation  $t_{4D}$  pour une augmentation du taux de nitrite de sodium aux fortes concentrations. Il est donc nécessaire d'intégrer les connaissances biologiques sur l'influence des différents facteurs considérés pour construire un modèle secondaire.

étude Réf.	[1] [1]	ol)] /vol)] [2]	] [] [3] []]	[4]	77] [5]	ol)] [6] [6]	[7] [6	(Whiting <i>et al.</i> , 1996)
Facteurs étudiés et gamme d'	Température [0; 15°C] pH [4; 5] huile d'origan [0; 2,1% (vol/p	Température [4 ; 42 °C] NaCl [0,5 ; 19,0 % (poids/v Acide lactique [0 ; 2 % (poids NaN0 <sub>2</sub> [0 ; 200 μg.ml <sup>-1</sup> ]	Température [4, 8, 12°C] phénol [5 ; 12,5 ; 20 ppm NaCl [2 ; 3 ; 4% (poids/vo	Température [20; 35°C] pH [4,5; 6,5] glucose [1; 4%] acide citrique [0,05; 0,1%	Température [6 ; 30°C] Activité de l'eau [0,85 ; 0,5	Température [4 ; 42 °C] NaCl [0,5 ; 19,0 % (poids/v pH [3,5 ; 7] Acide lactique [0 ; 1,5 % (poid NaN0 <sub>2</sub> [0 ; 200 μg.ml <sup>-1</sup> ]	Température [4 ; 42 °C] NaCl [0,5 ; 20,0 % (poids/v pH [3 ; 7] Lactate de sodium [0 ; 1% NaN0 <sub>2</sub> [0 ; 200 μg.ml <sup>-1</sup> ]	t al. 2006) : [6] (Whiting. 1993) : [7] (
milieu	Salade tarama Salade d'aubergine	Bouillon cœur cervelle	Bouillon d'enrichissement	mayonnaise	Chorizo	Bouillon cœur cervelle	Bouillon cœur cervelle	l 1997b) : [5] (Haimeer ei
Variables de réponses	Temps de latence à la mortalité Taux de destruction	t4D	$k_1$ $k_2$ $\lambda_1$ $\lambda_2$	t4D	αβ	t <sub>4D</sub> t <sub>1D</sub>	t <sub>4D</sub> t <sub>1D</sub>	Aembre et al 1997a) : [4] (Membre et a
Modèle primaire	Baranyi	bi linéaire (épaulement + inactivation) Whiting	Churchill et Usagi	exponentiel	Weibull	Whiting	Whiting	)) - [2] (Buchanan <i>et al</i> - 1994) - [3] (N
Genre espèce	Escherichia coli 0157:H7	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	Salmonella typhimurium	Salmonella spp.	Listeria monocytogenes Salmonella typhimurium	Staphylococcus aureus	[11] (Skandamis et Nyrchas 2000)

Tableau 1 Exemples de modèles secondaires polynomiaux utilisés pour l'inactivation non thermique

### 2.2.2. Modélisation modulaire

Opposée à ces modèles « boites noires », une autre approche est adoptée pour modéliser le comportement bactérien. Cette approche est tout aussi empirique que l'approche polynomiale. Elle ne conduit pas non plus à de meilleurs ajustements, mais elle repose sur l'intégration de la connaissance des phénomènes biologiques, la possibilité d'étendre le modèle à de nouveaux facteurs, l'interprétation biologique des paramètres, la parcimonie et la robustesse. Dans le domaine de la croissance bactérienne, le  $\gamma$  concept illustre parfaitement cette approche (Zwietering *et al.*, 1992). Un modèle de ce type peut s'exprimer de la forme :

$$\mu = \mu_{opt} \cdot \gamma_T(T) \cdot \gamma_{pH}(pH) \cdot \gamma_{a_w}(a_w) \cdot \xi(T, pH, a_w)$$
 Équation 21

Avec  $\mu$  le taux de croissance à la température *T*, au pH *pH* et à l'activité de l'eau  $a_w$ .  $\mu_{opt}$  est le taux de croissance en condition optimale. L'influence individuelle de chaque paramètre est exprimée par un terme  $\gamma$  et  $\xi$  est le terme reflétant l'influence des interactions entre les différents facteurs considérés. Chaque terme comprend des paramètres ayant un sens biologique par exemple la température minimale ou optimale de croissance. De plus chaque module a une valeur comprise entre 0 et 1. L'effet inhibiteur d'un facteur peut être alors quantifié par la valeur du terme. Si le terme est égal à 1, le facteur considéré est à la valeur optimale pour la croissance. Si le terme est égal à 0, le facteur ne permet pas la croissance.

Cette approche modulaire a été étendue à l'inactivation thermique tant au niveau des conditions de traitement que des conditions de revivification (Gaillard *et al.*, 1998; Mafart et Leguérinel, 1998; Couvert *et al.*, 1999). Par analogie aux modèles de croissance, les auteurs expriment la vitesse d'inactivation  $(1/\delta)$  plutôt que la résistance  $(\delta)$  dans des conditions données de traitement en fonction de la résistance  $(1/\delta^*)$  en conditions de références. Inspirés du modèle de Bigelow (1921), ces modèles sont de la forme :

$$\frac{1}{\delta} = \frac{1}{\delta^*} \cdot \gamma_T(T) \cdot \gamma_{pH}(pH) \cdot \gamma_{a_w}(a_w) \qquad \text{Équation 22}$$

Avec  $\delta$  le temps nécessaire pour atteindre la première réduction décimale (cf. paragraphe 2.1.3).  $\delta^*$  est alors la durée nécessaire à la première réduction décimale dans les conditions de référence « \* ». Chaque module reflète l'influence d'un facteur sur la résistance  $(\delta)$ .

Les conditions de référence peuvent être des conditions conventionnelles ou faire référence à un optimum de survie. Dans le cas de la température de traitement, plus la température de traitement est élevée plus la vitesse de destruction est élevée, la température de référence T<sup>\*</sup> est égale à 121,1°C. Dans le cas de l'activité de l'eau du milieu de revivification, il existe une valeur optimale pour la survie (Coroller *et al.*, 2001).

Peu de travaux adoptent l'approche modulaire (tableau 2). Chaque travail propose un modèle différent pour quantifier l'influence du stress acide sur la résistance bactérienne. La diversité des modèles et le faible nombre d'études ne permettent pas de juger de la robustesse des modèles proposés. Toutefois, Bréand (1998) propose un modèle de type « Bigelow » pour décrire l'inactivation d'*Escherichia coli* due à un stress acide. Ce modèle est de la forme suivante :

$$k = a.10^{\frac{\Delta pH}{Z}}$$
 Équation 23

Avec k le taux de destruction, Z est l'écart de pH entraînant une variation par 10 de k,  $\Delta pH$  est l'écart de pH entraînant le stress, et a est le taux de destruction sans variation de pH. L'évolution de la vitesse d'inactivation semble bien suivre une tendance exponentielle en fonction du pH, le modèle s'ajustant correctement quelque soit l'acidulant. Il permet de comparer l'efficacité des acides en fonction de la valeur de Z qui reflète la sensibilité du microorganisme vis-à-vis de l'acide utilisé. Plus la valeur de Z est grande, plus il faut une grande variation de pH pour faire varier le taux de destruction, et donc moins le microorganisme est sensible aux variations de pH.

	t <sub>4D</sub> linéaire Bouillon pH [3-7] cœur cervelle Acide malique [0; 2 M] [1]	t <sub>4D</sub> linéaire Bouillon pH [4;7] [2] t <sub>4D</sub> t <sub>4D</sub> cœur cervelle Acide citrique [0,1;2,0 M]	t <sub>4D</sub> linéaire Bouillon Acide acétique [0,1; 2,0 M] [3] cœur cervelle Acide lacítique [0,1; 2,0 M]	pH Bigelow Bouillon Acide chlorhydrique [2,25-3,00] Acide citrique [2,50;3,10] Acide lactique [3,20;3,60] Acide acétique [3,60;4,00]	Température [4 ; 40°C]8linéaireEau distilléeAcide citrique [1 ; 20%(poids/vol)]Acide lactique [0,2 ; 4%(poids/vol)]	, 1994); [3] (Buchanan <i>et al.</i> , 1993); [4] (Breand, 1998); [5] (Virto <i>et al.</i> , 2005)
milieu	Bouillon cœur cervelle	Bouillon cœur cervelle	Bouillon cœur cervelle	Bouillon cœur cervelle	Eau distillée	<i>t al.</i> , 1993); [4] (1
I ype de modèle secondaire	linéaire	linéaire	linéaire	Bigelow	linéaire	] (Buchanan ei
Variables de réponses	t <sub>4D</sub>	t <sub>4D</sub>	t <sub>4D</sub>	ĸ	ŷ	m, 1994); [3]
Modèle primaire	bi linéaire (épaulement + inactivation)	bi linéaire (épaulement + inactivation)	bi linéaire (épaulement + inactivation)	tri linéaire (épaulement + inactivation+ traînée)	Weibull	<i>t al.</i> , 1997) ; [2] (Buchanan et Golde
Genre espèce	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	Listeria monocytogenes	Escherichia coli	Yersinia entercolitica	[1](Buchanan et

Citons également le modèle proposé par Buchanan *et al.* (1993) pour l'effet des acides acétique, citrique, lactique et malique (Buchanan *et al.*, 1993; Buchanan et Golden, 1994, 1998). Ce modèle prend en compte la concentration en acide non dissocié et s'écrit :

$$\ln(t_{4D}) = a.\sqrt{[AH]} + b$$
 Équation 24

Il s'agit d'un modèle linéaire classique où a et b sont respectivement le coefficient directeur et l'ordonné à l'origine, et [AH] la concentration en acide non dissocié déterminée à partir du pH de l'environnement et le  $pK_a$  de l'acide par l'équation d'Henderson-Hasselbach.

Le dernier modèle est celui de Virto *et al.* (2005). Ces auteurs proposent eux aussi une régression linéaire, mais ils considèrent alors la concentration totale en acide comme facteur influant. Le modèle est de la forme :

$$\ln(\delta) = a[Acide] + b$$
 Équation 25

Avec  $\delta$  le temps nécessaire à la première réduction décimale (modèle de Weibull reparamétrisé par Mafart *et al.* (2002)), et [Acide] est la concentration en acide totale.

Ces deux modèles sont des régressions linéaires, ils peuvent être facilement reparamétrisées pour donner un modèle de la forme « Bigelow ».

# Références

- Abdul-Raouf, U., L. Beuchat, et M. Ammar. 1993. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground, roasted beef as affected by pH, acidulants, and temperature. Applied Environmental Microbiology 59: 2364-2368.
- Abee, T., et J. A. Wouters. 1999. Microbial stress response in minimal processing. International Journal of Food Microbiology 50: 65-91.
- Ahamad, N., et E. H. Marth. 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. Journal of Food Protection 52: 688-695.
- Albert, I., et P. Mafart. 2005. A modified Weibull model for bacterial inactivation. International Journal of Food Microbiology 100: 197-211.
- Angelidis, A. S., L. T. Smith, L. M. Hoffman, et G. M. Smith. 2002. Identification of OpuC as a Chill-Activated and Osmotically Activated Carnitine Transporter in Listeria monocytogenes. Applied Environmental Microbiology 68: 2644-2650.
- Annous, B. A., L. A. Becker, D. O. Bayles, D. P. Labeda, et B. J. Wilkinson. 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of Listeria monocytogenes at low temperatures. Applied Environmental Microbiology 63: 3887-3894.
- Audia, J. P., C. C. Webb, et J. W. Foster. 2001. Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. International Journal of Medical Microbiology 291: 97-106.
- Bachrouri, M., E. J. Quinto, et M. T. Mora. 2002. Survival of Escherichia coli O157:H7 during storage of yoghurt at different temperatures. Journal of Food Science 67: 1899-1903.
- Bachrouri, M., E. J. Quinto, et M. T. Mora. 2006. Kinetic parameters of Escherichia coli O157:H7 survival during fermentation of milk and refrigeration of home-made yoghurt. International Dairy Journal 16: 474-481.
- Bang, I. S., B. H. Kim, Y. K. Park, et J. W. Foster. 2000. OmpR regulates the stationaryphase acid tolerance response of Salmonella enterica serovar typhimurium. Journal of Bacteriology 182: 2245-52.
- **Baranyi, J., et T. A. Roberts. 1994.** A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology 23: 277-294.
- Baranyi, J., T. Ross, T. A. McMeekin, et T. A. Roberts. 1996. Effects of parameterization on the performance of empirical models used in "predictive microbiology". Food Microbiology 13: 83-91.
- Barker, C., et S. F. Park. 2001. Sensitization of Listeria monocytogenes to Low pH, Organic Acids, and Osmotic Stress by Ethanol. Applied Environmental Microbiology 67: 1594-1600.
- Beales, N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3: 1-20.
- Bearson, B. L., L. Wilson, et J. W. Foster. 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects Salmonella typhimurium against inorganic acid stress. Journal of Bacteriology 180: 2409-2417.

- Bearson, S., B. Bearson, et J. W. Foster. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiology Letters 147: 173-180.
- Becker, L. A., S. N. Evans, R. W. Hutkins, et A. K. Benson. 2000. Role of sigma B in Adaptation of Listeria monocytogenes to Growth at Low Temperature. Journal of Bacteriology 182: 7083-7087.
- Benjamin, M. M., et A. R. Datta. 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Applied Environmental Microbiology 61: 1669-1672.
- Berk, P. A., R. Jonge, M. H. Zwietering, T. Abee, et J. Kieboom. 2005. Acid resistance variability among isolates of Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104. Journal of Applied Microbiology 99: 859-866.
- **Beuchat, L. R., et A. J. Scouten. 2002.** Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. Journal of Applied Microbiology 92: 382-95.
- **Bigelow, W. D. 1921.** The logarithmic nature of thermal death curves. Journal of Infectious Diseases 29: 528-539.
- **Booth, I. R. 1999.** The regulation of intracellular pH in bacteria. Novartis Foundation Symposium 221: 19-28.
- **Booth, I. R. 2002.** Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. International Journal of Food Microbiology 78: 19-30.
- **Breand, S. 1998.** Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH, pp. 266. Université Claude Bernard, Lyon, France.
- Brehm-Stecher, B. F., et E. A. Johnson. 2004. Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews 68: 538-559.
- Brondsted, L., B. H. Kallipolitis, H. Ingmer, et S. Knochel. 2003. kdpE and a putative RsbQ homologue contribute to growth of Listeria monocytogenes at high osmolarity and low temperature. FEMS Microbiology Letters 219: 233-239.
- Buchanan, R. L., et M. H. Golden. 1994. Interaction of citric acid concentration and pH on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. Journal of Food Protection 57: 567-570.
- Buchanan, R. L., et M. H. Golden. 1998. Interactions Between pH and Malic Acid Concentration on the Inactivation of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Safety 18: 37-48.
- Buchanan, R. L., M. H. Golden, et R. C. Whiting. 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. Journal of Food Protection 56: 474-478.
- Buchanan, R. L., M. H. Golden, et J. G. Phillips. 1997. Expanded models for the nonthermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology 82: 567-577.
- Buchanan, R. L., M. A. Golden, R. C. Whiting, J. G. Phillips, et J. L. Smith. 1994. Nonthermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Science 59: 179-188.

- Calamita, G. 2000. The Escherichia coli aquaporin-Z water channel. Molecular Microbiology 37: 254-262.
- Carty, S. M., K. R. Sreekumar, et C. R. H. Raetz. 1999. Effect of Cold Shock on Lipid A Biosynthesis in Escherichia coli. induction at 12 °C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. J. Biol. Chem. 274: 9677-9685.
- Cerf, O. 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores, a review. Journal of Applied Bacteriology 42: 1-19.
- Chick, H. 1908. An investigation into the laws of disinfection. Journal of Hygiene 8: 92-158.
- Churchill, S. W., et R. Usagi. 1972. A General Expression for the Correlation of Rates of Transfer and Other Phenomena. American Institute Chemical Ingineering Journal 18: 1121-1128.
- Cole, M. B., K. W. Davies, G. Munro, C. D. Holyoak, et D. C. Kilsby. 1993. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of Listeria monocytogenes. Journal of Industrial Microbiology 12: 232-239.
- Conner, D., V. Scott, et D. Bernard. 1990. Growth, inhibition and survival of *Listeria* monocytogenes as affected by acidic conditions. Journal of Food Protection 53: 652-655.
- **Coroller, L., I. Leguerinel, et P. Mafart. 2001.** Effect of Water Activities of Heating and Recovery Media on Apparent Heat Resistance of *Bacillus cereus* Spores. Applied Environmental Microbiology 67: 317-322.
- **Corradini, M. G., et M. Peleg. 2003.** A model of microbial survival curves in water treated with a volatile disinfectant. Journal of Applied Microbiology 95: 1268-1276.
- Cotter, P. D., et C. Hill. 2003. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67: 429-453.
- **Couvert, O., I. Leguerinel, et P. Mafart. 1999.** Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of Bacillus cereus spores. International Journal of Food Microbiology 49: 57-62.
- **Couvert, O., S. Gaillard, N. Savy, P. Mafart, et I. Leguerinel. 2005.** Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. International Journal of Food Microbiology 101: 73-81.
- **Datta, A. R., et M. M. Benjamin. 1997.** Factors controlling acid tolerance of Listeria monocytogenes: effects of nisin and other ionophores. Applied Environmental Microbiology 63: 4123-4126.
- **Dilworth, M. J., et A. R. Glenn. 1999.** Problems of adverse pH and bacterial strategies to combat it. Novartis Foundation Symposium 221: 4-14.
- **Dodd, C. E. R., et T. G. Aldsworth. 2002.** The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. International Journal of Food Microbiology 74: 189-194.
- Duche, O., F. Tremoulet, P. Glaser, et J. Labadie. 2002. Salt Stress Proteins Induced in *Listeria monocytogenes*. Applied Environmental Microbiology 68: 1491-1498.
- **Dykes, G. A., et S. M. Moorhead. 2000.** Survival of osmotic and acid stress by Listeria monocytogenes strains of clinical or meat origin. International Journal of Food Microbiology 56: 161-166.

- El-Shenawy, M. A., et E. H. Marth. 1989. Inhibition or inactivation of *Listeria monocytogenes* by sodium benzoate together with some organic acids. Journal of Food Protection 52: 771-776.
- Erkmen, O. 2000. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in turkish white cheese during the ripening period. Journal of Food Engineering 46: 127-131.
- Faleiro, M. L., P. W. Andrew, et D. Power. 2003. Stress response of Listeria monocytogenes isolated from cheese and other foods. International Journal of Food Microbiology 84: 207-216.
- Fernandez, A., C. Salmeron, P. S. Fernandez, et A. Martinez. 1999. Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of Bacillus cereus. Trends in Food Science & Technology 10: 158-162.
- Fernandez, A., J. Collado, L. M. Cunha, M. J. Ocio, et A. Martinez. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of Bacillus cereus in vegetable substrate. International Journal of Food Microbiology 77: 147-153.
- Flessa, S., D. M. Lusk, et L. J. Harris. 2005. Survival of Listeria monocytogenes on fresh and frozen strawberries. International Journal of Food Microbiology 101: 255-262.
- **Foster, J. W. 1993.** The acid tolerance response of Salmonella typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. Journal of Applied Bacteriology 175: 1981-1987.
- **Foster, J. W. 1999.** When protons attack: Microbial strategies of acid adaptation. Current Opinion in Microbiology 2: 170-174.
- Foster, J. W., et H. K. Hall. 1990. Adaptive acidification tolerance response of Salmonella typhimurium. Journal of Bacteriology 172: 771-778.
- Foster, J. W., et H. K. Hall. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of Salmonella typhimurium. Journal of Bacteriology 173: 5129-5135.
- Gaillard, S., I. Leguerinel, et P. Mafart. 1998. Model for Combined Effects of Temperature, pH and Water Activity on Thermal Inactivation of Bacillus cereus Spores. Journal of Food Science 63: 887-889.
- Gawande, P. V., et A. A. Bhagwat. 2002. Protective effects of cold temperature and surfacecontact on acid tolerance of Salmonella spp. Journal of Applied Microbiology 93: 689-696.
- Geeraerd, A. H., C. H. Herremans, et J. F. V. Impe. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. International Journal of Food Microbiology 59: 185-209.
- Geeraerd, A. H., V. P. Valdramidis, et J. F. Van Impe. 2005. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. International Journal of Food Microbiology 102: 95-105.
- Geeraerd, A. H., V. P. Valdramidis, F. Devlieghere, H. Bernaert, J. Debevere, et J. F. Van Impe. 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. International Journal of Food Microbiology 91: 229-244.
- Gerhardt, P. N. M., L. Tombras Smith, et G. M. Smith. 2000. Osmotic and Chill Activation of Glycine Betaine Porter II in Listeria monocytogenes Membrane Vesicles. Journal of Bacteriology 182: 2544-2550.

- Greenacre, E. J., T. F. Brocklehurst, C. R. Waspe, D. R. Wilson, et P. D. G. Wilson. 2003. Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Listeria monocytogenes Acid Tolerance Response Induced by Organic Acids at 20°C: Optimization and Modeling. Applied Environmental Microbiology 69: 3945-3951.
- Guentert, A. M., R. H. Linton, R. H. Mohtar, M. L. Tamplin, J. B. Luchansky, et M. A. Cousin. 2003. Growth and inactivation of Listeria monocytogenes in pH-modified chicken salad during cold storage, pp. 167-169. *In* J. F. M. Van Impe, A. H. Geeraerd, I. Leguerinel and P. Mafart [eds.], Predictive Modelling in Foods, Quimper- france.
- Gutierrez, C., T. Abee, et I. R. Booth. 1995. Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. International Journal of Food Microbiology 28: 233-244.
- Hajmeer, M., I. Basheer, C. Hew, et D. O. Cliver. 2006. Modeling the survival of Salmonella spp. in chorizos. International Journal of Food Microbiology 107: 59-67.
- Hall, H. K., K. L. Karem, et J. W. Foster. 1995. Molecular responses of microbes to environmental pH stress. Advances in Microbial Physiology 37: 229-272.
- Hathcox, A., L. Beuchat, et M. Doyle. 1995. Death of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in real mayonnaise and reduced-calorie mayonnaise dressing as influenced by initial population and storage temperature. Applied Environmental Microbiology 61: 4172-4177.
- Heldman, D. R., et R. L. Newsome. 2003. Kinetic Models for Microbial Survival During Processing. Food Technology 57: 40-47.
- Hickey, E. W., et I. N. Hirshfield. 1990. Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Applied Environmental Microbiology 56: 1038-1045.
- Hicks, S. J., et B. M. Lund. 1991. The survival of Listeria monocytogenes in cottage cheese. Journal of Applied Bacteriology 70: 308-314.
- Hill, C., P. D. Cotter, R. D. Sleator, et C. G. M. Gahan. 2002. Bacterial stress response in Listeria monocytogenes: jumping the hurdles imposed by minimal processing. International Dairy Journal 12: 273-283.
- Holliday, S. L., et L. R. Beuchat. 2003. Viability of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in yellow fat spreads as affected by storage temperature. Journal of Food Protection 66: 549-558.
- Hsin-Yi, C., et C.-C. Chou. 2001. Acid adaptation and temperature effect on the survival of E. coli O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. International Journal of Food Microbiology 70: 189-195.
- Hurme, R., et M. Rhen. 1998. Temperature sensing in bacterial gene regulation what it all boils down to. Molecular Microbiology 30: 1-6.
- Hwang, C.-A., et M. L. Tamplin. 2005. The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of Listeria monocytogenes in seafood salad. International Journal of Food Microbiology 102: 277-285.
- ICMSF. 1996. Microorganisms in Foods 5. Characteristics of Microbial Pathogens. Blackie Academic & Professional, London.
- **Ishihama, A. 2000.** Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. Annual Review of Microbiology 54: 499-518.

- Ita, P., et R. Hutkins. 1991. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acid, lactic and hydrochloric acids. Journal of Food Protection 54: 15-19.
- Janssen, M., K. M. Vereecken, A. H. Geeraerd, A. Cappuyns, et J. F. Van Impe. 2004. Quantifying the inactivation of Listeria innocua through lactic acid, pp. 156-161. *In* t. I. C. o. E. a. Food [ed.], International Congress on Engineering and Food, Montpellier, France.
- Janssen, M., A. H. Geeraerd, A. Cappuyns, L. Garcia-Gonzalez, K. M. Vereecken, F. Devlieghere, et J. F. Van Impe. 2005. Separating lactic acid and pH effects on the Listeria innocua inactivation, pp. 231-237. *In* M. L. A. T. M. Hertog and B. M. Nicolaï [eds.], III International Symposium on Applications of Modelling as an Innovative Technology in the Agri-Food Chain; MODEL-IT. International Society for Horticultural Science, Leuven, Belgium.
- Kamau, D. N., S. Doores, et K. M. Pruitt. 1990. Enhanced thermal destruction of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus by the lactoperoxidase system. Applied Environmental Microbiology 56: 2711-2716.
- Kazmierczak, M. J., S. C. Mithoe, K. J. Boor, et M. Wiedmann. 2003. Listeria monocytogenes sigma B Regulates Stress Response and Virulence Functions. Journal of Bacteriology 185: 5722-5734.
- Kempf, B., et E. Bremer. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. Archives of Microbiology 170: 319-30.
- Ko, R., L. T. Smith, et G. M. Smith. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on Listeria monocytogenes. Journal of Bacteriology 176: 426-431.
- Kolb, F. 2001. Rôle de deux ARN dans le controle de l'expression des gènes: Regulation de la réplication du plasmide R1 par un ARN antisens et des gènes de virulence de Staphylocoque aureus par l'ARN-III, pp. 216. Université Louis Pasteur, Strasbourg, France.
- Koutsoumanis, K., et J. N. Sofos. 2004. Comparative acid stress response of Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium after habituation at different pH conditions. Letters in Applied Microbiology 38: 321-326.
- Koutsoumanis, K., K. Lambropoulou, et G. E. Nychas. 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. International Journal of Food Microbiology 49: 63-74.
- Larson, A. E., E. A. Johnson, et J. H. Nelson. 1999. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. Journal of dairy science 82: 1860 - 1868.
- Le Marc, Y., C. Pin, et J. Baranyi. 2005. Methods to determine the growth domain in a multidimensional environmental space. International Journal of Food Microbiology 100: 3-12.
- Lee, I. S., J. L. Slonczewski, et J. W. Foster. 1994. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in Salmonella typhimurium. Journal of Bacteriology 176: 1422-1426.
- Lee, R. E., et C. A. Gilbert. 1918. On the Application of the Mass Law to the Process of Disinfection—being a Contribution to the "Mechanistic Theory" as opposed to the "Vitalistic Theory". journal of physical chemistry 22: 348 372.

- Lekkas, C., A. Kakouri, E. Paleologos, L. P. Voutsinas, M. G. Kontominas, et J. Samelis. 2006. Survival of Escherichia coli O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 °C. Food Microbiology 23: 268-276.
- Leroy, F., et L. de Vuyst. 1999. Temperature and pH Conditions That Prevail during Fermentation of Sausages Are Optimal for Production of the Antilisterial Bacteriocin Sakacin K. Applied Environmental Microbiology 65: 974-981.
- Leroy, F., K. Lievens, et L. De Vuyst. 2005. Modeling Bacteriocin Resistance and Inactivation of Listeria innocua LMG 13568 by Lactobacillus sakei CTC 494 under Sausage Fermentation Conditions. Applied Environmental Microbiology 71: 7567-7570.
- Little, C. L., M. R. Adams, W. A. Anderson, et M. B. Cole. 1994. Application of a loglogistic model to describe the survival of *Yersinia enterocolitica* at sub-optimal pH and temperature. International Journal of Food Microbiology 22: 63-71.
- Liu, S., J. E. Graham, L. Bigelow, P. D. Morse, II, et B. J. Wilkinson. 2002. Identification of Listeria monocytogenes Genes Expressed in Response to Growth at Low Temperature. Applied Environmental Microbiology 68: 1697-1705.
- Mafart, P., et I. Leguérinel. 1998. Modelling combined effect of temperature and pH on the heat resistance of spores by a non-linear Bigelow equation. Journal of Food Science 63: 6-8.
- Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, et I. Leguerinel. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of Weilbull frequency distribution model. International Journal of Food Microbiology 72: 107-113.
- Martinez-Antonio, A., S. C. Janga, H. Salgado, et J. Collado-Vides. 2006. Internal-sensing machinery directs the activity of the regulatory network in Escherichia coli. Trends in Microbiology 14: 22-27.
- Maurer, L. M., E. Yohannes, S. S. Bondurant, M. Radmacher, et J. L. Slonczewski. 2005. pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in Escherichia coli K-12. Journal of Bacteriology 187: 304-319.
- McMeekin, T. A., J. Olley, D. A. Ratkowsky, et T. Ross. 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. International Journal of Food Microbiology 73: 395-407.
- Membre, J.-M., B. Leporq, M. Vialette, E. Mettler, L. Perrier, D. Thuault, et M. Zwietering. 2005. Temperature effect on bacterial growth rate: quantitative microbiology approach including cardinal values and variability estimates to perform growth simulations on/in food. International Journal of Food Microbiology 100: 179.
- Membre, J. M., J. Thurette, et M. Catteau. 1997a. Modelling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology 82: 345-350.
- Membre, J. M., V. Majchrzac, et I. Jolly. 1997b. Effects of temperature, pH, glucose and citric acid on the inactivation of *Samonella typhimurium* in reduced calorie mayonnaise. Journal of Food Protection 60: 1497-1501.
- Metzner, M., J. Germer, et R. Hengge. 2004a. Multiple stress signal integration in the regulation of the complex sigma S-dependent csiD-ygaF-gabDTP operon in Escherichia coli. Molecular Microbiology 51: 799-811.
- Metzner, M., J. Germer, et R. Hengge. 2004b. Multiple stress signal integration in the regulation of the complex σS-dependent csiD-ygaF-gabDTP operon in Escherichia coli. Molecular Microbiology 51: 799-811.

- Miller, A. J. 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. Journal of Food Protection 55: 414-418.
- **O'Byrne, C. P., et I. R. Booth. 2002.** Osmoregulation and its importance to food-borne microorganisms. International Journal of Food Microbiology 74: 203-216.
- **O'Driscoll, B., C. G. M. Gahan, et C. Hill. 1997.** Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Analysis of the Acid Tolerance Response in Listeria monocytogenes LO28. Applied Environmental Microbiology 63: 2679-2685.
- Park, C. M., et L. R. Beuchat. 2000. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in potato starch as affected by water activity, pH and temperature. Letters in Applied Microbiology 31: 364-367.
- Peleg, M., et M. B. Cole. 1998. Reinterpretation of Microbial Survival Curves. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38: 353-380.
- Peleg, M., et C. M. Penchina. 2000. Modelling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40: 159-172.
- Phan-Thanh, L., F. Mahouin, et S. Alige. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 55: 121-126.
- Pichereau, V., A. Hartke, et Y. Auffray. 2000. Starvation and osmotic stress induced multiresistances. Influence of extracellular compounds. International Journal of Food Microbiology 55: 19-25.
- **Poolman, B., et E. Glaasker. 1998.** Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. Molecular Microbiology 29: 397-407.
- Ramos, J. L., M.-T. Gallegos, S. Marques, M.-I. Ramos-Gonzalez, M. Espinosa-Urgel, et A. Segura. 2001. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. Current Opinion in Microbiology 4: 166-171.
- Richard, H., et J. W. Foster. 2004. Escherichia coli glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. Journal of Bacteriology 186: 6032-6041.
- Ross, E. W., I. A. Taub, C. J. Doona, F. E. Feeherry, et K. Kustin. 2005. The mathematical properties of the quasi-chemical model for microorganism growth-death kinetics in foods. International Journal of Food Microbiology 99: 157-171.
- Ross, T., et P. Dalgaard. 2003. Secondary models, pp. 63-150. *In* R. C. McKellar and X. Lu [eds.], Modelling microbial responses in food. CRC press, Boca Ranton (USA).
- **Russell, N. J. 1984.** Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. Trends in Biochemical Sciences 9: 108-112.
- Rychlik, I., et P. A. Barrow. 2005. Salmonella stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. FEMS Microbiology Reviews 29: 1021-1040.
- **Ryu, J. H., Y. Deng, et L. R. Beuchat. 1999.** Behavior of acid-adapted and unadapted *Escherichia coli* O157:H7 when exposed to reduced pH achieved with various organic acids. Journal of Food Protection 62: 451-455.
- Samelis, J., J. N. Sofos, P. A. Kendall, et G. C. Smith. 2001. Influence of the Natural Microbial Flora on the Acid Tolerance Response of Listeria monocytogenes in a Model System of Fresh Meat Decontamination Fluids. Applied Environmental Microbiology 67: 2410-2420.

- Shabala, L., B. Budde, T. Ross, H. Siegumfeldt, et T. McMeekin. 2002. Responses of Listeria monocytogenes to acid stress and glucose availability monitored by measurements of intracellular pH and viable counts. International Journal of Food Microbiology 75: 89-97.
- Shahamat, M., A. Seaman, et M. Woodbine. 1980. Survival of *Listeria monocytogenens* in high salt concentration. Zentralblatt Fur Bakteriologie Hygienie A 246: 506-511.
- Skandamis, P. N., et G.-J. E. Nychas. 2000. Development and Evaluation of a Model Predicting the Survival of Escherichia coli O157:H7 NCTC 12900 in Homemade Eggplant Salad at Various Temperatures, pHs, and Oregano Essential Oil Concentrations. Applied Environmental Microbiology 66: 1646-1653.
- Skandamis, P. N., et G. E. Nychas. 2003. Modeling the microbial interaction and the death of Escherichia coli O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives. Journal of Food Protection 66: 1166-75.
- Skandamis, P. N., K. W. Davies, P. J. McClure, K. Koutsoumanis, et T. Tassou. 2002. A vitalistic approach for non-thermal inactivation of pathogens in traditional Greek salads. Food Microbiology 19: 405-421.
- Sleator, R. D., et C. Hill. 2002. Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. FEMS Microbiology Reviews 26: 49-71.
- Sorrells, K., et D. Enigl. 1989. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Safety 11: 31-37.
- Sperber, W. 1983. Influence of water activity on food borne bacteria. Journal of Food Protection 46: 142-150.
- **Takumi, K., R. De Jonge, et A. Havelaar. 2000.** Modelling inactivation of *Escherichia coli* by low pH: application to passage through the stomach of young and elderly people. Journal of Applied Microbiology 89: 935-943.
- **Tetteh, G. L., et L. R. Beuchat. 2003.** Survival, growth, and inactivation of acid-stressed *Shigella flexneri* as affected by pH and temperature. International Journal of Food Microbiology 87: 131-138.
- Thieringer, H. A., P. G. Jones, et M. Inouye. 1998. Cold shock and adaptation. BioEssays 20: 49-57.
- Valdramidis, V. P., A. H. Geeraerd, K. Bernaerts, F. Devlieghere, J. Debevere, et J. F. Van Impe. 2004. Accurate Modelling of Non-Loglinear Survival Curves. Bulletin of the international dairy federation: 97-110.
- van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International Journal of Food Microbiology 74: 139-59.
- Vasseur, C., L. Baverel, M. Hébraud, et J. Labadie. 1999. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology 86: 469-476.
- Virto, R., D. Sanz, I. Alvarez, Condon, et J. Raso. 2005. Inactivation kinetics of Yersinia enterocolitica by citric and lactic acid at different temperatures. International Journal of Food Microbiology 103: 251-257.
- Wang, G., T. Zhao, et M. Doyle. 1996. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. Applied Environmental Microbiology 62: 2567-2570.

- Wemekamp-Kamphuis, H. H., J. A. Wouters, P. P. L. A. de Leeuw, T. Hain, T. Chakraborty, et T. Abee. 2004. Identification of Sigma Factor sigma B-Controlled Genes and Their Impact on Acid Stress, High Hydrostatic Pressure, and Freeze Survival in Listeria monocytogenes EGD-e. Applied Environmental Microbiology 70: 3457-3466.
- Whiting, R. C. 1993. Modeling bacterial survival in unfavorable environments. Journal of Industrial Microbiology 12: 240-246.
- Whiting, R. C., et R. L. Buchanan. 1993. A classification of models in predictive microbiology—a reply to K.R. Davey. Food Microbiology 10: 175-177.
- Whiting, R. C., S. Sackitey, S. Calderone, K. Morely, et J. G. Phillips. 1996. Model for the Survival of *Staphylococcus aureus* in Nongrowth Environments. International Journal of Food Microbiology 31: 231-243.
- Wood, J. M. 1999. Osmosensing by Bacteria: Signals and Membrane-Based Sensors. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63: 230-262.
- Wood, J. M., E. Bremer, L. N. Csonka, R. Kraemer, B. Poolman, T. van der Heide, et L. T. Smith. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 130: 437.
- Xiong, R., G. Xie, A. E. Edmondson, et M. A. Sheard. 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. International Journal of Food Microbiology 46: 45-55.
- Young, K., et P. Foegeding. 1993. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria* monocytogenes Scott A and the effect of intracellular pH. Journal of Applied Bacteriology 74: 515-520.
- Zaika, L. L. 2001. The effect of temperature and low pH on survival of *Shigella flexneri* in broth. Journal of Food Protection 64: 1162-1165.
- Zaika, L. L., et J. G. Phillips. 2005. Model for the combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on survival of Shigella flexneri strain 5348 under aerobic conditions. International Journal of Food Microbiology 101: 179-187.
- Zwietering, M. H., T. Wijtzes, J. C. De Wit, et K. van't Riet. 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. Journal of Food Protection 55: 973-979.

# **Objectifs et Stratégie des travaux**

Comparé au domaine de la croissance bactérienne ou à celui de l'inactivation thermique, le champ de modélisation de l'inactivation non thermique en est encore à ses premiers balbutiements. Si la physiologie de la réponse au stress est très étudiée, si les principaux facteurs influents sur la vitesse d'inactivation et leur mode d'action sont également bien connus, seuls quelques rares travaux traitent de la modélisation de l'inactivation non thermique. Aucune modélisation primaire ne se dégage vraiment des travaux réalisés et aucun modèle n'est capable de décrire l'ensemble des allures de courbes de survie et leur évolution en fonction de l'intensité du stress ou de l'état physiologique de la population.

L'un des objectifs de ces travaux est de développer un nouveau modèle primaire permettant de décrire l'évolution de populations bactériennes quelle que soit la nature ou l'intensité du stress subi et l'état physiologique des cellules.

Les facteurs environnementaux communément reconnus comme les plus importants sont étudiés : l'acidité avec l'effet du pH et la concentration en acide lactique non dissocié, l'activité de l'eau avec le chlorure de sodium comme dépresseur, et la température de stockage. La modélisation de la vitesse d'inactivation en fonction de ces facteurs a déjà été réalisée en choisissant, entre autre comme réponse caractéristique de la résistance, le  $t_{nD}$  et une approche polynomiale au niveau secondaire (Chapitre 1). Toutefois, l'absence de véritable modèle primaire ne permet pas une extrapolation de la prédiction de l'inactivation bactérienne à d'autres milieux que celui utilisé, ni à d'autres taux de réduction décimale que celui choisi (correspondant à la valeur de n).

L'ambition de ces travaux est de proposer un outil de simulation plus général, intégrant les connaissances des phénomènes physiologiques responsables de la mort bactérienne. L'étude de l'influence des facteurs de stress se fera en milieu synthétique et selon une approche mono factorielle, afin de favoriser une modélisation secondaire de type modulaire. Ce type de démarche devant conduire à terme à l'extrapolation à de nouveaux milieux.

Classiquement, la modélisation du comportement bactérien se réalise en trois étapes : modélisation primaire, secondaire et tertiaire. Les deux premières étapes sont réalisées en milieu synthétique, afin de limiter le nombre de facteurs pouvant influencer la résistance bactérienne. Pour pouvoir prédire l'impact de variations physicochimiques sur la résistance d'une population bactérienne en aliment, il est nécessaire *de valider les modèles primaires et secondaires développés au sein de nouveaux environnements*.

Deux bactéries cibles ont été choisies pour ces travaux : *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*. Ce choix a été guidé bien sûr par le fait qu'il s'agit de pathogènes d'origine alimentaire importants pour l'homme, mais aussi à cause de leurs différences physiologiques dans l'objectif de *construire des modèles primaires et secondaires robustes reflétant un comportement bactérien général*. La simplicité des modèles et l'interprétation des paramètres sont favorisés pour permettre une plus grande facilité d'utilisation.
# Chapitre 2 :

# Modélisation Primaire et influence des conditions de préculture sur la résistance bactérienne

# 1. Développement d'un modèle primaire

La forme des courbes de survie est dépendante de l'état physiologique de la population bactérienne stressée, de l'intensité du stress, et de sa nature. L'objectif de ces travaux est donc dans un premier temps de développer un modèle primaire permettant de décrire les courbes de survie de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*. Il doit répondre au cahier des charges suivant :

- Ce modèle devra décrire les formes les plus complexes d'évolution de la survie des bactéries dans le temps (sigmoïdale, biphasique avec épaulement,...), mais aussi être capable de décrire des formes plus simples (concave, convexe, linéaire).
- Suivant ce modèle, la taille de la population survivante devra tendre vers zéro quand la durée d'exposition au stress tend vers l'infini (pas d'asymptote inférieure)
- Par ailleurs, les paramètres primaires devront, soit rester constants, soit évoluer selon une tendance claire en fonction des facteurs environnementaux de stress, ou en fonction de l'état physiologique initiale de la population bactérienne.
- Enfin, les différents paramètres devront avoir une signification biologique, chimique ou biophysique, afin de faciliter leur utilisation.

L'utilisation du modèle de Weibull pour décrire la résistance bactérienne au stress thermique s'est généralisée, durant les cinq dernières années (Peleg et Cole, 1998; Fernandez *et al.*, 1999; Peleg et Penchina, 2000; Mafart *et al.*, 2002; van Boekel, 2002). Les cinétiques de destruction thermique dans le temps de population bactérienne sont alors décrites par le modèle :

$$N(t) = N_0.10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p}$$
 Équation (1)

avec t le temps d'exposition au stress en heure, N l'effectif de la population (UFC.ml<sup>-1</sup>) au temps t,  $N_0$  l'effectif initial de la population au temps t=0,  $\delta$  le temps nécessaire à la première réduction décimale (h) et p la courbure de la cinétique (p < 1 : convexe ; p=1 : linéaire ; p>1 : concave). Afin de décrire une évolution en sigmoïde des cinétiques d'inactivation et selon une démarche analogue à celle de Whiting (Whiting, 1993), nous posons comme hypothèse que la population est constituée de deux sous-groupes dont la résistance au stress suit chacune une distribution de Weibull. La survie de la population peut donc s'exprimer selon l'équation suivante :

$$N(t) = N_0 \cdot \left( f \cdot 10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^{p_1}} + (1 - f) \cdot 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^{p_2}} \right)$$
 Équation (2)

Avec *f* la proportion de la sous-population la moins résistante, dans la population totale. Ce rapport (associé à son complément 1–*f*) a toutefois l'inconvénient de n'être pas assez discriminant, notamment au voisinage de 0 ou de l'unité. Il est donc remplacé par sa transformation logit, dont les valeurs varient entre  $-\infty$  et  $+\infty$ . Le nouveau paramètre ( $\alpha$ ) est donc défini par l'équation suivante :

$$\alpha = \log_{10} \left( \frac{f}{1 - f} \right)$$
 Équation (3)

qui est équivalente à :

$$f = \frac{10^{\alpha}}{1+10^{\alpha}} \quad \text{Équation (4)}$$

L'équation du modèle permettant de décrire la survie de la population devient :

$$N(t) = \frac{N_0}{1+10^{\alpha}} \left[ 10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^{p_1} + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^{p_2}} \right] \text{ Équation (5)}$$

Les courbes de survie de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* présentent différentes parties correspondant à la mort des individus composant les sous-populations 1 et 2. Ces deux fragments des courbes de survie sont tous deux concaves. Le modèle peut être simplifié en utilisant un p unique pour les deux sous-populations. Cette simplification est validée par l'utilisation d'un test basé sur le rapport de vraisemblance (Huet *et al.*, 2003). Le modèle primaire de survie est alors :

$$N(t) = \frac{N_0}{1+10^{\alpha}} \left[ 10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^p + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^p} \right] \quad \text{équation (6)}$$

Ce modèle, décrivant la survie bactérienne, possède cinq paramètres ( $N_0$ ,  $\alpha$ , p,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ), et chacun d'entre eux peut être interprété graphiquement en observant la courbe de survie (figure 1). Ainsi, nous pouvons remarquer que le paramètre  $\alpha$  peut être défini par le logarithme décimal des rapports des effectifs initiaux des deux sous-populations à partir de l'équation (3) (figure 1). Le paramètre p reflète la courbure de la pente. Si sa valeur est inférieure à 1 la courbe de survie présente une concavité tournée vers le haut, le taux de

mortalité diminue avec le temps d'exposition au stress, les cellules s'adaptent au cours du temps. Si *p* est égale à 1, la courbe de survie est linéaire, le taux de mortalité est constant. Enfin, si *p* est supérieur à 1, le taux de mortalité augmente avec le temps de traitement, plus les bactéries sont soumises au stress, plus elles sont sensibles. Enfin, les paramètres  $\delta_l$  et  $\delta_2$  caractérisent la résistance des deux sous-populations à un stress donné.  $\delta_l$  est inférieure à  $\delta_2$ , la sous-population 2 étant la plus résistante.



Figure 1 Diagramme du modèle de survie suivant une double distribution de Weibull de la résistance au stress.

Dans le cadre de nos travaux, la population bactérienne est issue de différents stades de croissance d'une préculture. La résistance au stress est étroitement liée à l'initiation de mécanismes de résistance qui apparaissent avec l'entrée en phase stationnaire (Lee *et al.*, 1994; O'Driscoll *et al.*, 1996). Les deux sous-populations considérées par le modèle pourraient correspondre aux organismes ayant plus ou moins activé des mécanismes de résistance au stress. Le paramètre  $\alpha$  devrait varier en fonction de l'état physiologique de la population et par conséquent en fonction du stade de croissance de la préculture. Si des conditions de préculture permettent aux cellules de mieux résister aux stress par différents systèmes, nous devrions obtenir une évolution de la forme de la courbe de survie comme simulée figure 2, où l'augmentation de la résistance de la population est reflétée par la diminution de la valeur du paramètre  $\alpha$ . La sous-population 1 représentant les bactéries les plus sensibles au stress, et la sous-population 2 représentant au contraire les cellules les plus résistantes, la diminution de  $\alpha$  correspond alors à l'augmentation de la proportion de cellules résistantes dans la population totale.



Figure 2 Représentation de l'évolution de la forme des cinétiques de survie en fonction de la valeur de  $\alpha$ .(—)population totale ; (--)sous-population 1 ; (-.-)sous-population 2.

Cette hypothèse est validée par les résultats de nos travaux pour *Listeria* monocytogenes et Salmonella typhimurium. Mais en plus de la diminution de  $\alpha$ , une augmentation de  $\delta_1$  est observée. Cette augmentation de  $\delta_1$  associée à la stabilité du paramètre p reflète une augmentation de la résistance la plus probable de la population. D'un point de vue descriptif, ce modèle permet de rendre compte de l'ensemble des courbes de survie caractéristiques qui peuvent être rencontrées, contrairement au modèle de Whiting incapable de décrire les courbes de survie biphasiques avec latence. De plus, le modèle de Whiting possède trois paramètres évoluant en fonction de l'état physiologique, contre deux pour le modèle double de Weibull.

# Références

- Fernandez, A., C. Salmeron, P. S. Fernandez, et A. Martinez. 1999. Application of a frequency distribution model to describe the thermal inactivation of two strains of *Bacillus cereus*. Trends in Food Science & Technology 10: 158-162.
- Huet, S., A. Bouvier, M. A. Gruet, et E. Jolivet. 2003. Statistical Tools for Nonlinear Regression. A Practical Guide with S-PLUS Examples. Springer-Verlag, New-York.
- Lee, I. S., J. L. Slonczewski, et J. W. Foster. 1994. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology 176: 1422-1426.
- Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, et I. Leguerinel. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of Weilbull frequency distribution model. International Journal of Food Microbiology 72: 107-113.
- **O'Driscoll, B., C. Gahan, et C. Hill. 1996.** Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Applied Environmental Microbiology 62: 1693-1698.
- Peleg, M., et M. B. Cole. 1998. Reinterpretation of Microbial Survival Curves. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38: 353-380.
- Peleg, M., et C. M. Penchina. 2000. Modelling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40: 159-172.
- van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International Journal of Food Microbiology 74: 139-59.
- Whiting, R. C. 1993. Modeling bacterial survival in unfavorable environments. Journal of Industrial Microbiology 12: 240-246.

# 2. <u>General model based on two mixed Weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves</u>

Article publié dans Applied and Environmental Microbiology 2006. Vol. 72, No. 10, pages 6493-6502

#### Abstract

Cells of *Listeria monocytogenes* or *Salmonella enterica* serovar Typhimurium taken from six characteristic stages of growth were subjected to an acidic stress (pH 3.3). As expected, the bacterial resistance increased from the end of the exponential phase to the late stationary phase. Moreover, the shapes of the survival curves gradually evolved as the physiological states of the cells changed. A new primary model, based on two mixed Weibull distributions of cell resistance, is proposed to describe the survival curves and the change in the pattern with the modifications of resistance of two assumed subpopulations. This model resulted from simplification of the first model proposed. These models were compared to the Whiting's model. The parameters of the proposed model were stable and showed consistent evolution according to the initial physiological state of the bacterial population. Compared to the Whiting's model, the proposed model allowed a better fit and more accurate estimation of the facilitated their interpretation.

# 2.1 Introduction

When the thermal or non-thermal inactivation of spores or vegetative microorganisms is considered, the log-linear shape of bacterial survival curves is a particular case among types of curves (11, 16, 42, 48). In the case of non-thermal inactivation caused by unfavorable environmental conditions, the shape of curves presents a more pronounced heterogeneity according to the intensity of a stress. A bacterial strain can present different shapes of survival curves. Frequently concave curves may become convex or sigmoidal when the intensity of the stress varies (6, 9, 10, 18, 23, 37, 44, 46, 47). The patterns of survival curves may also vary with the physiological state of the cells and are dependent on the phase of growth (exponential or stationary phase), but also on the conditions of adaptation before the stress (17, 24, 35).

In order to model non-thermal inactivation curves, numbers of primary models were proposed. Among theses models, we can find the vitalistic models proposed by *Cole et al.* (12) (27, 38), models describing both the growth and the inactivation (25, 26, 31, 36, 39, 40), the modified Gompertz model (23, 31), the exponential model (30), log-linear with latency time (10) or/and with tail (5). These models cannot deal with all shapes of curves and most of them are based on log-linear inactivation.

Some models can describe non log linear decrease or sigmoïdal inactivation curves. The Weibull model was largely used in thermal and non-thermal treatment area. It is based on

the hypothesis that the resistance to stress of a population follows a Weibull distribution (13, 18, 33, 43, 44). This type of model can describe linear, concave or convex curves. It was modified and extended to sigmoidal curve in the field of heat treatment (2). The model of Baranyi and Roberts (3) and that of Geeraerd *et al.* (16) can describe linear shape with or without shoulder or tail and sigmoidal shapes (20, 21). These models, which can describe sigmoidal curves, assume that the probability of survival aims towards an asymptote when the time aims towards infinity. Although they imply that there is no further inactivation regardless of additional treatment, and their implementation does not raise any problem for short treatment time, they seem to overestimate the survival of the population for prolonged durations.

Others models are based on the hypothesis that two subgroups having different resistance to stress coexist in the bacterial population. Cerf proposed the first model based on this assumption and on the log-linear decrease (11). Derived from this model, the Xiong's model includes a latency time to mortality (48). These models still have the disadvantage of the log-linear decrease in the population. Moreover, the Xiong's model has a discontinuity. The Whiting's model involves a sum of two logistic models corresponding to the two subpopulations which are characterized by their difference in resistance to stress (46). It was used to describe the non-thermal inactivation of *Salmonella, Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in brain heart infusion (BHI) broth (10, 46, 47). The main advantage of this model is that it can describe many shapes of inactivation curves often observed in non thermal inactivation.

Despite the number of proposed models, none is flexible enough so that it reflects all changes of shapes with the intensity of the stress or with the physiological state of the cells (17). In order to partially bypass this problem, utilization of the time for four decimal reductions became widespread (6-10, 30, 31, 45-47). The concept of the time for four decimal reductions has the advantage of reflecting the evolution of the inactivation rate with respect to the various physicochemical factors studied, regardless of the patterns of various curves which can be related to a similar strain. On the other hand, this simplification does not give any information about the shape of the curves and does not allow prediction of the bacterial survival at any time of the exposure to stress.

Analysis of non-thermal inactivation requires a model to fill this gap. In addition to robustness, parsimony, simplicity of use, biological interpretation of parameters and derivability with respect to time (for a review, see (16)), the primary model should be able to describe as many shapes of inactivation curves as possible with the following requirements.

(i) The complete model should allow progressive simplification in order to fit simplest shapes of curves, including the log-linear first-order kinetics.

(ii) Even when survival curves are convex for long exposure times, the number of surviving cells should tend toward zero when the time tends toward the infinite; in other words, the model should not include a lower asymptote of decimal logarithm of surviving cells.

And (iii) The parameters of the model which are dependent on environmental or physiological conditions should allow a simple secondary modeling.

The model proposed by Whiting (46) may partially meet these requirements. The purpose of this work is to develop a new primary model of inactivation and to compare it with the Whiting's model using data acquired at varying physiological states of the population.

#### 2.2. Materials and methods

#### 2.2.1 Microorganism and inoculum preparation

The studied bacterial strains were *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain ADQP 305 isolated from brine (obtained from ADRIA) and *Listeria monocytogenes* strain SOR 100 isolated from meat product (obtained from SOREDAB). The strains were stored at -80°C in medium consisting of BHI (BIOKAR DIAGNOSTICS) broth supplemented with 50% (vol/vol) glycerol. Vegetative cells were recovered in 100 ml of BHI broth in 250-ml flask at 37°C and shaken at 100 rotations per minute. After 8 h of incubation, a portion 1% (v/v) was transferred to a second flask containing 100 ml BHI broth. In these conditions, growth began at the average of  $10^7$  CFU.ml<sup>-1</sup>.

To study the influence of the physiological state of bacteria on inactivation, the cells were removed at different phases of the growth. A sample (1 ml) of culture was removed and diluted in BHI broth, in order to obtain a concentration close to  $10^7$  CFU.ml<sup>-1</sup>. The inactivation medium was inoculated (1%, vol/vol) with this suspension. Each inactivation kinetic is obtained for one inoculum preparation, and then, one culture.

#### 2.2.1. Inactivation media and enumeration of survivors

A basic BHI broth (BIOKAR DIAGNOSTICS) was modified in order to generate stress leading to inactivation. The broth was acidified with hydrochloric acid at pH=3.3. To avoid any change in the constituents of the modified broth by heating, it was filtered on a sterile 0.22- $\mu$ m-pore-size membrane (Steritop system; Millipore Corporation, Billerica, MA, U.S.A.). Then, 100 ml of this broth was dispended sterilely into culture flasks (250 ml), which had previously been sterilized by autoclaving (121.1°C 20 min). Micro-organisms were inoculated into 100 ml of modified BHI broth to obtain a concentration of approximately 10<sup>5</sup> CFU.ml<sup>-1</sup>. The inactivation flasks were put in an incubator shaker (100 rpm) at 12°C.

Survivors were enumerated immediately after inoculation and at appropriate time intervals by surface plating cultures using a Spiral Plater (WASP1, Don Whitley, Shipley, West Yorkshire, United Kingdom). If dilution was necessary for enumeration, 0.5 ml was removed and diluted in the same modified BHI broth as the inactivation medium; 1, 2, 4, and 10 ml were removed to obtain the last four counts. Based on the conditions used for inactivation, organisms were counted after different incubation times (24 to 72 hrs) at 37°C.

#### 2.2.2. Tested models

#### Model 1:

The Whiting's model (46) is derived from the model proposed by Kamau *and al.* (22), based on the logistic model. It relies on the coexistence of two subpopulations with different levels of resistance to stress (47):

$$N(t) = N_0 \left[ f \frac{1 + e^{-k_1 \cdot t_{lag}}}{1 + e^{-k_1 \cdot (t - t_{lag})}} + (1 - f) \frac{1 + e^{-k_2 \cdot t_{lag}}}{1 + e^{-k_2 \cdot (t - t_{lag})}} \right]$$
(1)

Where t is time,  $N_0$  is the initial bacterial concentration, f is the fraction of the original population in the major group,  $t_{lag}$  is the latency time to mortality or shoulder period,  $k_1$  and  $k_2$  are the inactivation rates of major and secondary populations, respectively.

#### Model 2:

The Weibull model has been widely used to describe bacterial resistance to thermal stress during the past few decades in heat treatment studies but also in non-thermal treatment studies (33, 43). Reparametrization of the Weibull survival model (equation (2)) was proposed and used in these studies (28, 44).

$$N(t) = N_0 \cdot 10^{-\left(\frac{t}{\delta}\right)^p}$$
(2)

Where N is the number of survivors,  $N_0$  is the inoculum size, t is the time, p is a shape parameter, and  $\delta$  is the treatment time for the first decimal reduction.

In order to describe all shapes of inactivation kinetics, it was assumed that the population is composed of two groups that differ in their levels of resistance to stress. The resistance of each subpopulation is assumed to follow a Weibull distribution. Then the size of the surviving population can be described by the following equation:

$$N(t) = N_0 \left( f.10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^{p_1}} + (1-f).10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^{p_2}} \right)$$
(3)

Where the subcripts 1 and 2 indicate the two different subpopulations. Subpopulation 1 is more sensitive to stress than the subpopulation 2 is  $(\delta_1 < \delta_2)$ . *f* is the fraction of subpopulation 1 in the population.

Without mathematical transformation, the *f* ratio provides insufficient discrimination. For fraction *f* varying from 0 to 1, in order to have a more discriminating parameter, a new parameter ( $\alpha$ ), varying from negative infinity to positive infinity, was introduced based on logit transformation of *f*:

$$\alpha = \log_{10} \left( \frac{f}{1 - f} \right) \tag{4}$$

This is equivalent to:

$$f = \frac{10^{\alpha}}{1+10^{\alpha}} \tag{5}$$

With this transformation, an *f* ratio equal to 0.999999 or an *f* ratio equal to 0.999900 corresponds to  $\alpha$  values of 4 and 6 respectively. This is equivalent to a 100-fold increase in the initial size of subpopulation 2. After introduction of the  $\alpha$  value, the equation (3) became:

$$N(t) = \frac{N_0}{1+10^{\alpha}} \left[ 10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^{p_1} + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^{p_2}} \right]$$
(6)

#### Model 3:

When enumeration at low concentration was possible, the right part of the curves, corresponding to the most resistant subpopulation, subpopulation 2, seemed to be convex like the most sensitive subpopulation, subpopulation 1. It was then proposed that the equation should be simplified by applying the same shape parameter to the two subpopulations. The final model was:

$$N(t) = \frac{N_0}{1+10^{\alpha}} \left[ 10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^{p} + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^{p}} \right]$$
(7)

#### 2.2.3. <u>Parameter estimation, confidence intervals and model</u> <u>evaluation</u>

To describe the evolution of survival curves, the survival  $(N_i)$  (expressed in CFU.ml<sup>-1</sup>) during time was expressed as follows:

$$Y_i = f(t_i, \theta) + \varepsilon_i \tag{8}$$

Where  $Y_i$  is the decimal logarithm of  $N_i$ , and f is the regression function. The vectors of parameters of models  $\theta$  were estimated by minimization of the sum of square of the residual values ( $\varepsilon_i$ ) defined by:

$$C(\theta) = \sum_{i=1}^{n} \left( Y_i - f(t_i, \theta) \right)^2$$
(9)

Where n is the number of data. The minimum  $C(\theta)$  values were computed with a nonlinear fitting module (NLINFIT, MATLAB 6.1, Optimization Toolbox; The Math-works).

The fit of the models was compared using the Akaike Information Criterion (AIC) (1):

$$AIC = -2.\ell(\theta) + 2.p \tag{10}$$

Where *p* is the number of parameters of the model, and  $\ell(\theta)$  is the log-likelihood. In the case of Gaussian observations, the least square estimator of  $\theta$  is also the maximum likelihood estimator (19). The logarithm of the likelihood is generally used instead of the likelihood itself, and it is defined as follows:

$$\ell(\theta) = -\frac{n}{2} \cdot \log(2\pi) - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} \left[ \log(Var(\varepsilon_i)) + \frac{(Y_i - f(t_i, \theta))^2}{Var(\varepsilon_i)} \right]$$
(11)

where *n* is the number of points of the curve, and  $Var(\varepsilon_i)$  is the variance of the residual

 $\varepsilon_i$ .

The AIC permits comparisons of models by taking both the goodness of fit and the parsimony into account (1, 29). A great number of parameters or a poor quality of fit (small log-likelihood value) corresponds to a high AIC value. Then best models yield the lowest AIC values.

The likelihood ratio test was used to test whether  $p_1$  and  $p_2$  parameters of the model 2 are identical, in order to check the validity of the model 3 (19). If  $\theta_H$  is the estimation of  $\theta$ under the constraint of the equality of the parameters, equivalent to the estimate of the model 3 parameters and if  $\theta_A$  is the unconstraint estimation of  $\theta$ , equivalent to the estimate of the model (2) parameters,

$$S_L = -2.\left[\ell(\theta_H) - \ell(\theta_A)\right]$$
(12)

is the statistic test. If  $p_1$  and  $p_2$  parameters are equal, the  $S_L$  value is small. When *n* tends to infinity, it can be shown that the limiting distribution of  $S_L$  is  $\chi^2$  distributed with one degree of freedom (difference in dimensionality of  $\theta_A$  and  $\theta_H$ ).

# 2.3. <u>Results</u>

#### 2.3.1. Influence of the physiological state of cells on the pattern of survival curves

The cells which were subjitted to an acid stress at pH 3.3 were removed at the six following characteristic phases of growth (figure1):

- (i) Beginning of the exponential phase (1.67 h after inoculation; optical density at 600 nm  $[OD_{600}]$  for *L. monocytogenes*, 0.10;  $OD_{600}$  for *S. enterica* serovar typhimurium, 0.15).
- (ii) Middle of the exponential phase  $(3.33 \text{ h after inoculation; } OD_{600} \text{ for } L.$ monocytogenes, 0.20; OD<sub>600</sub> for S. enterica serovar Typhimurium, 0.60).
- (iii) End of the exponential phase (5 h after inoculation;  $OD_{600}$  for *L*. *monocytogenes*, 0.55;  $OD_{600}$  for *S. enterica* serovar Typhimurium, 0.70).
- (iv) Deceleration phase (6.67 h after inoculation, O.D.<sub>600nm</sub> for *L. monocytogenes*, 0.70 and for *S. enterica* serovar Typhimurium , 0.75).
- (v) Early stationary phase (12 h after inoculation;  $OD_{600}$  for *L. monocytogenes*, 0.80;  $OD_{600}$  for *S. enterica* serovar Typhimurium, 0.85).
- (vi) Late stationary phase (17 h after inoculation;  $OD_{600}$  for *L. monocytogenes*, 0.85;  $OD_{600}$  for *S. enterica* serovar Typhimurium, 0.80).



Figure 1 Evolution of the population size (o)  $(cfu.ml^{-1})$ , the optical density at 600nm ( $\diamond$ ) and the pH (\*) during growth preceding inactivation of <u>L. monocytogenes</u> (a) and <u>S. enterica</u> serovar Typhimurium (b). The characteristic phases of growth are the beginning of the exponential phase (i), middle of the exponential phase (ii), end of the exponential phase (iii), deceleration of the exponential phase (iv), early stationary phase (v), late stationary phase (vi).

The survival curves of *S. enterica* serovar Typhimurium show continuous and progressive evolution from a biphasic shape to a simple concave shape whether cells are taken from early or late stages of growth (figure 2). This evolution seems to correspond to the gradual disappearance of a sensitive subpopulation. In the case of *L. monocytogenes* (figure 3), the initial presence of two subpopulations is less clear, but a drastic increase in the general resistance of bacteria is observed; while the elimination of the total population seems to occure within around 3 days for cells of the early stage of growth (figure 3, i), it takes more than 30 days before the same level of inactivation is reached when cells are removed at the late stationary phase (figure 3, vi).

# 2.3.2. Quality of fit

We compared the Whiting's model (model 1) and the two new proposed models for describing the survival of bacteria at various times during incubation of subcultures (figure 2, figure 3).

Model 2, which includes one more parameter than the other ones, provided, as expected, the best fit for the data according to the minimum sum of squares  $[C(\theta)]$  for 16 of 20 curves observed (table 1). However, this model was the worst according to the AIC, which takes both the fit and the parsimony into account. In most cases, the Whiting's model (model 1) and the simplified model (model 3) showed quite similar results for goodness of fit according to the AIC criterion. The double Weibull simplified model (model 3) showed a slight tendency for better fit with 14 smaller AIC for the 20 kinetics observed. In some cases, there were great differences between the two AIC in favor of the model 3 (table 1; figure 2 panels vi, and figure 3 panels *iii* and *vi*). In these cases the model 3 provided a very small AIC value compared to the value for model 1; the difference could be as high as about 20 U for *Salmonella* and 70 U for *Listeria*.

It was also noted that the confidence intervals related to the Whiting's model (model 1) were larger, especially for the f value (results not shown). The confidence intervals of the estimated parameters and the AIC of the model 3 were smaller, showing that there was better estimation of parameters and better compromise between the goodness of fit and the parsimony.

The hypothesis that there were equality between the  $p_1$  and  $p_2$  of the model 2 was at the origin of the model 3. If the likelihood ratio test value ( $S_L$ ) is lower than the value of the  $\chi^2$ with 1 degree of freedom for a significance level of 0.05, the tested hypothesis cannot be rejected. The hypothesis was not rejected by the likelihood ratio test in 15 of 20 cases (table 1). One of the two repetitions was not validated for the cases form iii to vi of *Listeria monocytogenes*. The AIC criterion was favorable to the simplification of the double Weibull model. This simplification allowed removing one parameter while keeping nearly the same goodness of fit.

# 2.3.3. Effect of the physiological state on the estimated parameters of models

According to the Whiting's model (model 1) for the two studied species, the estimated f ratio decreased from 100% to 30% after 300 minutes of incubation of the subculture, while estimated values of  $t_{lag}$  increased from an average of 15 hrs to more than 100 hrs and then seemed to stabilize at an average of 720 min (model 1) (figure 4 and figure 5). For *Salmonella*, the estimated  $t_{lag}$  values were very different for the last two replicates, but the

associated confidence intervals were wide. For the two species studied,  $k_1$  value fell to a value close to  $k_2$  which was approximately constant (average, 0.01 h<sup>-1</sup>).

The estimated  $\delta_2$  values of the model 2 did not seem to change with the duration of the incubation of the subculture; for *Salmonella*, this value was close to 200 hrs. For the two species, the  $\delta_1$  values increased from 15 h to more than 100 h and tended toward the  $\delta_2$  values. The values of  $\alpha$  decreased from 4 or 5 for *Salmonella* and *Listeria*, respectively, to 1, equivalent to *f* values of 99.990%, 99.999% and 90.909%, respectively. However, the profiles of the evolution of the parameters were quite different. For *Salmonella*, the values of  $\alpha$  was 4 for incubation of the subculture less than 300 minutes, after this the  $\alpha$  value decreased to 1. In contrast to the  $\alpha$  value for *Salmonella*, which decreased quickly from 5.3 to 2 for incubation less than 400 min long, for *Listeria* the  $\alpha$  value continued to decrease slowly to 1 after this time. The  $p_1$  and  $p_2$  values were very variable and were between 1 and 31.

With the double Weibull simplified model (model 3), the changes in the  $\delta$  parameters were similar to the changes observed with the model 2. The only differences in behavior between these two models concerned the  $\alpha$  and p parameters. Compared to the model 2, the rate of decrease of estimated  $\alpha$  values for the model 3 was less variable for the two species. The p value was relatively stable except for cells from the late stationary phase, for which the value had a slight tendency to increase for *Salmonella*. The median of the p value was close to 2 for the two species.

Organism	Culture phase	Repetition	Lenght of incubation of subculture (min)	n	С(ө)			S.	AIC		
					Model 1	Model 2	Model 3	$\mathbf{S}_L$	Model 1	Model 2	Model 3
S. enterica serovar	Beginning of exponential	1	100	13	0.119	0.082	0.089	0.92	-14.11	-16.85	-17.93
Typhimurium	Mild-exponential	1	200	16	0.742	0.677	0.751	1.65	6.31	6.84	6.49
	End of exponential	1	300	19	1.796	1.602	1.602	0.00	19.13	18.96	16.96
	-	2	300	20	1.131	0.984	1.027	0.03	11.33	9.38	7.41
	Deceleration of exponential	1	400	24	1.054	1.069	1.115	1.00	3.12	5.45	4.46
		2	400	22	0.822	0.784	0.784	0.02	2.14	1.09	-0.90
	Early stationary	1	720	38	0.825	0.772	0.874	4.73	-27.67	-28.22	-25.49
	5 5	2	720	33	1.246	1.039	1.108	2.11	-2.48	-8.44	-8.33
	Late stationary	1	1020	31	2.067	1.018	1.122	3.00	14.04	-5.91	-4.91
	·	2	1020	34	1.510	1.085	1.085	0.00	2.61	-8.62	-10.62
L. monocytogenes	Beginning of exponential	1	100	11	0.452	0.455	0.460	0.14	6.15	8.22	6.35
	Mild-exponential	1	200	16	1.076	1.045	1.046	0.01	12.25	13.78	11.79
	End of exponential	1	300	33	7.618	0.887	0.887	0.01	55.29	-13.69	-15.69
		2	300	29	0.689	0.549	0.552	6.58	-14.13	-20.7	-22.54
	Deceleration of exponential	1	400	30	1.452	1.196	1.444	5.65	4.31	0.48	4.13
		2	400	48	3.244	2.324	2.326	0.03	18.9	2.89	0.92
	Early stationary	1	720	32	0.560	0.542	0.571	1.72	-28.65	-27.7	-27.99
	5 5	2	720	41	1.592	0.361	0.591	20.15	-4.84	-65.63	-47.48
	Late stationary	1	1020	36	1.069	1.057	1.059	0.04	-14.44	-12.82	-14.78
	5	2	1020	46	2.655	0.812	0.935	6.5	9.35	-43.17	-38.67

Table 1 Minimum  $C(\theta)$  and AIC for the different survival curves of <u>S. enterica</u> serovar Typhimurium and <u>L. monocytogenes</u><sup>*a*</sup>.

<sup>*a*</sup> The  $S_L$  values are related to the simplification of model 2 used to obtain model 3; boldface SL values represent rejection of the simplification. Boldface  $C(\theta)$  and AIC values are the best  $C(\theta)$  and AIC values.



model (model 1); dotted line, model 2; dashed line, simplified model (3). The data obtained are indicated by symbols. i, ii, iii, iv, v and vi indicate the characteristic phases of growth from which the inocula used for inactivation kinetics analysis were obtained (see the legend to Figure 2 Evolution of the shape of survival curves of  $\underline{S. enterica}$  serovar Typhimurium and fitted curves of the models. Solid line, Whiting's figure 1); 1 and 2 indicate repetitions.







Figure 4 Evolution of the estimated parameters versus time of incubation of subculture for <u>S</u>. <u>enterica</u> serovar Typhimurium for Whiting's model (model 1), the double Weibull model (model 2), and the double Weibull simplified model (model 3). •,  $k_1$ , f,  $t_{lag}$ ,  $\delta_1$ ,  $\alpha$ , p and  $p_1$ values;  $\circ$ ,  $k_2$ ,  $\delta_2$  and  $p_2$  values.



Figure 5 Evolution of the estimated parameters versus the time of incubation of subculture for <u>L. monocytogenes</u> for Whiting's model (model 1), the double Weibull model (model 2), and the double Weibull simplified model (model 3). •,  $k_1$ , f,  $t_{lag}$ ,  $\delta_1$ ,  $\alpha$ , p and  $p_1$  values;  $\circ$ ,  $k_2$ ,  $\delta_2$  and  $p_2$  values.

# 2.4. Discussion

As expected, the resistance of bacterial populations to stress increased as the stationary phase approached. Such an increase of the bacterial resistance of cultures results from the initiation of mechanisms depending on physicochemical factors of the bacterial environment but also on the reduction of the metabolic activity of cells (4, 24, 32, 41). A clear change in shape of the inactivation kinetic curves was noted.

The evolution of the parameter values related to models was directly linked to the increase in the resistance. The inactivation rate  $(k_1)$  or the first decimal reduction time  $(\delta_1)$  of the more sensitive population increased, while the rate of inactivation of the resistant population was unchanged over a wide range. The decrease in the *f* ratio, or its logit  $\alpha$ , corresponding to an increase in the ratio for the more resistant cells, occurred at the beginning of this change. Whiting's model had five parameters, four of which,  $(k_1, k_2, f, \text{ and } t_{lag})$  characterize the evolution of the resistance of the overall population with respect to the duration of incubation of the subculture. On the other hand, the double Weibull simplified model (model 3) had also five parameters, but only three of these parameters ( $\delta_1$ ,  $\delta_2$ , and  $\alpha$ ) were related to the physiological state of cells and environmental conditions.

Furthermore, the models 1 and 3 presented equivalent qualities of fit except for f for *Salmonella* (figure 2, table 1) and f and c for *Listeria* (figure 3, table 1). In these cases, the shape of the kinetics was biphasic nonlinear. Whiting's model is based on a linear decrease in the size of the subpopulation after latency to mortality. It was unable to describe the concave decrease observed in these cases, which explains the bad AIC value related to Whiting's model (model 1). The double Weibull simplified model (model 3) is more flexible and could describe the biphasic nonlinear shape (p parameter higher than 1) as well as the biphasic linear case (p parameter equal to 1).

With narrower confidence intervals, the double Weibull model described the adaptation of cells better than the model of Whiting. For the first four periods of incubation corresponding to the exponential phase of a subculture, the time necessary for the first decimal reduction ( $\delta_1$ ) value increased and stabilized at the  $\delta_2$  value during the stationary growth phase of the subculture (figure 4 and figure 5). This change indicated that there was adaptation of the cells from the more sensitive subpopulation, subpopulation 1, whose level of resistance to stress tended gradually towards the level of resistance of subpopulation 2. The resistance of the subpopulation 2 is stable. The  $\alpha$  value decreased as the subculture progressed through various stages of growth, indicating the increase in the ratio of the subpopulation resistant to stress. The increase in the resistance to stress was described well by the combined changes in all parameters, which indicated the progressive change in resistance from sensitive to resistant. Subpopulation 1 assumed by the model was the more sensitive subpopulation and did not activate or slightly activated the mechanisms of resistance. The population 2 corresponded to the most resistant cells which had restricted metabolic activity and developed the mechanisms of resistance. When the resistance is minimal and when the resistance is maximal, a single population should be observed corresponding to the subpopulations 1 and 2, respectively. Then, the resistance to stress should follow a simple Weibull distribution.



Figure 6 Diagram of survival model based on the double Weibull distribution of resistance. Solid line, microbial population; dashed line, subpopulation 1; dotted line, subpopulation 2. Subpopulation 1 represented bacteria that were more sensitive to the stress, and subpopulation 2 represented the cells that were more resistant.

One advantage of the parameterization and simplification of the model 3 is that all parameters can be graphically interpreted (figure 6), as follows:

- $N_0$  is the initial size of the population;
- $\delta$  is the time of the first logarithm decline for the two subpopulations;
- $\alpha$  is defined as the logit of f and is equivalent to:

$$\alpha = \log_{10} \left( \frac{N_{0_1}}{N_{0_2}} \right)$$

and the  $\alpha$  value then is close to the graphic difference between  $log_{10}(N_0)$  and the logarithm of the population size where the inflexion is observed;

- and *p* represents the shape of the curve (see below).

In theory, the  $\alpha$  value can be equal to all real numbers. In practice, no inflection point can be obviously observed graphically for a negative  $\alpha$  value. This is also the case if the value is higher than the difference between  $log_{10}(N_0)$  and the decimal logarithm of detection limit of the technique for enumeration. In this case, the  $\alpha$  value is not observed and cannot be estimated.



Figure 7 Different shapes of inactivation curves, including: biphasic with a non linear decrease (curve a), sigmoidal (curve b), concave (curve c), linear (curve d), convex (curve e), biphasic (curve f), linear with tail (curve g).

The double Weibull simplified model allows workers to fit most of the shapes of inactivation curves (figure 7). With two populations, it can describe, in the general case, biphasic shape with non linear decrease (figure 7, curve a). Note that this shape cannot be described by the other models used in the bacterial inactivation field in constant conditions of stress. The model can also describe a sigmoidal shape (curve b) if  $\delta_2$  tends toward infinity, biphasic shape (curve f) if p is equal to 1, and a linear shape with tail (curve g) if  $\delta_2$  tends toward infinity and p is equal to 1.

Simplification of the double Weibull model to a simple model can be obtained by using a negative value of  $\alpha$ , or  $\alpha > \log_{10}(N_0 / detection limit)$ , or equality between the two  $\delta$  values. Then, the model permits fitting of a linear shape (curve d) if p=1, a concave shape (curve c) if p>1, and a convex shape (curve e) if p<1.

Further research is required to allow the use of the double Weibull model in nonthermal inactivation studies. The evolution of p depending on the environmental factors and the physiological state of cells requires a special attention. For the thermal treatment, the p value can be considered as constant (14, 15, 34, 43). The advantage of the Weibull model is that it has great flexibility because of a strong correlation between the scale ( $\delta$ ) and the shape (p) parameters. If the p value is estimated to be constant for different conditions of stress, the  $\delta$  parameter is able to balance this constraint to give a good quality of fit of the model for the data. If this phenomenon could be confirmed in nonthermal inactivation studies, the double Weibull model might be a convenient model describing the kinetics as a function of the physiological state of the cells and the stress conditions with only three parameters. Indeed, the  $\delta$  parameters might change according to the intensity of stress, and the  $\delta_I$  and  $\alpha$  parameters might change according to the physiological state of the treated cells, as shown here.

#### Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Agriculture via the "Aliment Qualité Sécurité" program, in association with the national program in predictive microbiology Sym'previus. A Ph.D. fellowship was granted to L.C. by the UNIR (Ultrapropre, Nutrition, Industrie, Recherche) Association and the National Association of Technical Research.

# References

- 1. Akaike, H. (1973). Information theory and extension of the maximum likelihood principle, p. 267-281. *In* B.N. Petrov and and F. Cza'ki, (ed.). Proceedings of the 2nd International Symposium of Information Theory, Akademiai Kiado, Budapest.
- 2. Albert, I., and P. Mafart. 2005. A modified Weibull model for bacterial inactivation. International Journal of Food Microbiology 100:197-211.
- 3. Baranyi, J., and T. A. Roberts. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. International Journal of Food Microbiology 23:277-294.
- 4. Booth, I. R. 2002. Stress and the single cell: Intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. International Journal of Food Microbiology 78:19-30.
- 5. Breand, S. 1998. Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH. Université Claude Bernard, Lyon, France.
- 6. Buchanan, R. L., and M. H. Golden. 1994. Interaction of citric acid concentration and pH on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. Journal of Food Protection 57:567-570.
- 7. Buchanan, R. L., and M. H. Golden. 1998. Interactions Between pH and Malic Acid Concentration on the Inactivation of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Safety 18:37-48.
- 8. Buchanan, R. L., M. H. Golden, and J. G. Phillips. 1997. Expanded models for the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology 82:567-577.
- 9. Buchanan, R. L., M. H. Golden, and R. C. Whiting. 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. Journal of Food Protection 56:474-478.
- 10. Buchanan, R. L., M. H. Golden, R. C. Whiting, J. G. Phillips, and J. L. Smith. 1994. Non-thermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Science 59:179-188.
- 11. Cerf, O. 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores, a review. Journal of Applied Bacteriology 42:1-19.
- 12. Cole, M. B., K. W. Davies, G. Munro, C. D. Holyoak, and D. C. Kilsby. 1993. A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. Journal of Industrial Microbiology 12:232-239.
- 13. Corradini, M. G., and M. Peleg. 2003. A model of microbial survival curves in water treated with a volatile disinfectant. Journal of Applied Microbiology 95:1268-1276.
- 14. Couvert, O., S. Gaillard, N. Savy, P. Mafart, and I. Leguerinel. 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. International Journal of Food Microbiology 101:73-81.
- 15. Fernandez, A., J. Collado, L. M. Cunha, M. J. Ocio, and A. Martinez. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of Bacillus cereus in vegetable substrate. International Journal of Food Microbiology 77:147-153.
- 16. Geeraerd, A. H., C. H. Herremans, and J. F. V. Impe. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. International Journal of Food Microbiology 59:185-209.
- 17. Greenacre, E. J., T. F. Brocklehurst, C. R. Waspe, D. R. Wilson, and P. D. G. Wilson. 2003. Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Listeria monocytogenes Acid

Tolerance Response Induced by Organic Acids at 20°C: Optimization and Modeling. Applied Environmental Microbiology 69:3945-3951.

- 18. Hajmeer, M., I. Basheer, C. Hew, and D. O. Cliver. 2006. Modeling the survival of *Salmonella spp*. in chorizos. International Journal of Food Microbiology 107:59-67.
- 19. Huet, S., A. Bouvier, M. A. Gruet, and E. Jolivet. 2003. Statistical Tools for Nonlinear Regression. A Practical Guide with S-PLUS Examples, Springer-Verlag ed. Springer-Verlag, New-York.
- Janssen, M., A. H. Geeraerd, A. Cappuyns, L. Garcia-Gonzalez, K. M. Vereecken, F. Devlieghere, and J. F. Van Impe. 2005. Presented at the III International Symposium on Applications of Modelling as an Innovative Technology in the Agri-Food Chain; MODEL-IT, Leuven, Belgium.
- 21. Janssen, M., K. M. Vereecken, A. H. Geeraerd, A. Cappuyns, and J. F. Van Impe. 2004. Presented at the International Congress on Engineering and Food, Montpellier, France.
- 22. Kamau, D. N., S. Doores, and K. M. Pruitt. 1990. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. Applied Environmental Microbiology 56:2711-2716.
- 23. Koutsoumanis, K., K. Lambropoulou, and G. E. Nychas. 1999. A predictive model for the non-thermal inactivation of *Salmonella enteritidis* in a food model system supplemented with a natural antimicrobial. International Journal of Food Microbiology 49:63-74.
- 24. Lee, I. S., J. L. Slonczewski, and J. W. Foster. 1994. A low-pH-inducible, stationaryphase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. Journal of Bacteriology 176:1422-1426.
- 25. Leroy, F., and L. de Vuyst. 1999. Temperature and pH Conditions That Prevail during Fermentation of Sausages Are Optimal for Production of the Antilisterial Bacteriocin Sakacin K. Applied Environmental Microbiology 65:974-981.
- Leroy, F., K. Lievens, and L. De Vuyst. 2005. Modeling Bacteriocin Resistance and Inactivation of *Listeria innocua* LMG 13568 by *Lactobacillus sakei* CTC 494 under Sausage Fermentation Conditions. Applied Environmental Microbiology 71:7567-7570.
- 27. Little, C. L., M. R. Adams, W. A. Anderson, and M. B. Cole. 1994. Application of a log-logistic model to describe the survival of *Yersinia enterocolitica* at sub-optimal pH and temperature. International Journal of Food Microbiology 22:63-71.
- 28. Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, and I. Leguerinel. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of Weilbull frequency distribution model. International Journal of Food Microbiology 72:107-113.
- 29. McQuarrie, A. D., and C.-L. Tsai. 1998. Regression and Time Series Model Selection. World Scientific Publishing, River Edge.
- 30. Membre, J. M., V. Majchrzac, and I. Jolly. 1997. Effects of temperature, pH, glucose and citric acid on the inactivation of *Samonella typhimurium* in reduced calorie mayonnaise. Journal of Food Protection 60:1497-1501.
- 31. Membre, J. M., J. Thurette, and M. Catteau. 1997. Modelling the growth, survival and death of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology 82:345-350.
- 32. O'Driscoll, B., C. Gahan, and C. Hill. 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Applied Environmental Microbiology 62:1693-1698.
- 33. Peleg, M., and M. B. Cole. 1998. Reinterpretation of Microbial Survival Curves. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38:353-380.
- 34. Peleg, M., and C. M. Penchina. 2000. Modelling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40:159-172.

- 35. Phan-Thanh, L., F. Mahouin, and S. Alige. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 55:121-126.
- 36. Ross, E. W., I. A. Taub, C. J. Doona, F. E. Feeherry, and K. Kustin. 2005. The mathematical properties of the quasi-chemical model for microorganism growth-death kinetics in foods. International Journal of Food Microbiology 99:157-171.
- 37. Samelis, J., J. N. Sofos, P. A. Kendall, and G. C. Smith. 2001. Influence of the Natural Microbial Flora on the Acid Tolerance Response of *Listeria monocytogenes* in a Model System of Fresh Meat Decontamination Fluids. Applied Environmental Microbiology 67:2410-2420.
- 38. Skandamis, P. N., K. W. Davies, P. J. McClure, K. Koutsoumanis, and T. Tassou. 2002. A vitalistic approach for non-thermal inactivation of pathogens in traditional Greek salads. Food Microbiology 19:405-421.
- 39. Skandamis, P. N., and G. E. Nychas. 2003. Modeling the microbial interaction and the death of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Spanish-style green table olives. Journal of Food Protection 66:1166-75.
- 40. Takumi, K., R. De Jonge, and A. Havelaar. 2000. Modelling inactivation of *Escherichia coli* by low pH: application to passage through the stomach of young and elderly people. Journal of Applied Microbiology 89:935-943.
- 41. Testerman, T. L., A. Vazquez-Torres, Y. Xu, J. Jones-Carson, S. J. Libby, and F. C. Fang. 2002. The alternative sigma factor sigmaE controls antioxidant defences required for *Salmonella virulence* and stationary-phase survival. Molecular Microbiology 43:771-82.
- 42. Valdramidis, V. P., A. H. Geeraerd, K. Bernaerts, F. Devlieghere, J. Debevere, and J. F. Van Impe. 2004. Accurate Modelling of Non-Loglinear Survival Curves. Bulletin of the international dairy federation 392:97-110.
- 43. van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International Journal of Food Microbiology 74:139-59.
- 44. Virto, R., D. Sanz, I. Alvarez, Condon, and J. Raso. 2005. Inactivation kinetics of *Yersinia enterocolitica* by citric and lactic acid at different temperatures. International Journal of Food Microbiology 103:251-257.
- 45. Whiting, R. C. 1995. Microbial modeling in foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 35:467-494.
- 46. Whiting, R. C. 1993. Modeling bacterial survival in unfavorable environments. Journal of Industrial Microbiology 12:240-246.
- 47. Whiting, R. C., S. Sackitey, S. Calderone, K. Morely, and J. G. Phillips. 1996. Model for the Survival of *Staphylococcus aureus* in Nongrowth Environments. International Journal of Food Microbiology 31:231-243.
- 48. Xiong, R., G. Xie, A. E. Edmondson, and M. A. Sheard. 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. International Journal of Food Microbiology 46:45-55.

# **Chapitre 3 : Modélisation Secondaire**

#### 1. Développement de modèles secondaires

Le modèle primaire développé repose sur l'hypothèse que la résistance bactérienne au stress suit une double distribution Weibull. En se référant toujours aux deux espèces *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*, le comportement des différents paramètres du modèle primaire (N<sub>0</sub>,  $\alpha$ ,  $\delta_1$ , $\delta_2$ ,p) est étudié en faisant varier la nature du stress et son intensité. A partir des données physiologiques connues sur les deux germes, le pH, la concentration en acide non dissocié et la concentration en chlorure de sodium ont été retenus comme facteurs d'influence. La température est étudiée sur une gamme allant de 4°C à 35°C. Cette gamme n'engendre en soi aucun effet létal, mais entre en interaction avec les autres facteurs environnementaux précités.

L'influence de ces facteurs sur la résistance bactérienne est étudiée par le biais de plans mono factoriels. Ce choix est motivé par l'objectif d'obtenir un modèle modulaire proche du « gamma concept » et des modèles cardinaux (Zwietering et al., 1992; Rosso et al., 1995; Augustin, 2000; Le Marc et al., 2002). Pour les facteurs susceptibles de causer une mortalité cellulaire (pH, concentration en acide lactique non dissocié et en chlorure de sodium), deux plans d'expériences sont réalisés à 12°C, température a priori optimale pour la survie bactérienne (Whiting, 1993; Buchanan et al., 1994; Lekkas et al., 2006) (cf. chapitre 1). Le premier est effectué dans un domaine où seul un facteur est responsable de l'inactivation. Par exemple pour le pH, l'étude est effectuée en BHI acidifié par de l'acide chlorhydrique de pH 3,0 à pH 4,0 pour les deux espèces. Le second plan permet d'étudier l'influence de ce même facteur sur une gamme plus large. L'inactivation n'étant pas possible en BHI natif dans la totalité de la gamme allant de pH 3,0 à 8,0, un stress complémentaire, de nature différente, est ajouté pour créer l'inactivation la plus faible possible dans les conditions optimales de survie pour le facteur étudié. Concrètement pour l'étude du pH, nous avons utilisé un bouillon BHI additionné de chlorure de sodium 10% ou 12% (m/m) pour respectivement Listeria monocytogenes et Salmonella typhimurium. Le pH de ce milieu est par ailleurs ajusté dans une gamme allant de 3,0 à 8,0.

Par contre la température ne provoque pas un stress létal dans la gamme allant de 4°C à 35°C. La variation de la température d'incubation conduit à une modulation de la vitesse d'inactivation. Trois stress de natures différentes entraînant une vitesse de destruction proche ont été choisis : acidification à pH 3,4 par un acide fort, à pH 5,5 et 1,2 M d'acide lactique et addition de 18% ou 20% de sel en fonction de l'espèce bactérienne. Durant l'exposition à chacun de ces stress, les fioles d'inactivation sont stockées à différentes températures d'incubation.

L'ensemble des résultats est en accord avec les travaux qui ont pu être réalisés jusqu'à présent (cf. Chapitre 1). La survie bactérienne est optimale à un pH proche de 6,5 pour les deux germes. La résistance est diminuée par augmentation de la concentration en acide lactique non dissocié. Concernant l'addition de sel, deux zones ont des actions distinctes sur la résistance des microorganismes. Pour la première allant de 0 à 10% (m/m), pour laquelle la résistance est fortement diminuée par addition de sel. Par contre au-delà, la résistance devient presque stable. Concernant la température, différents effets sont observés selon la nature du stress. Un optimum proche de 12°C est bien observé mais seulement pour un stress dû à une acidification par un acide fort. Pour un stress osmotique ou un stress dû à une acidification par l'acide lactique, plus la température est basse plus la vitesse d'inactivation est lente.

Afin de modéliser l'influence de ces différents facteurs sur la résistance bactérienne des deux sous-populations, nous avons proposé un modèle de la forme :

$$\log_{10}(\delta) = \log_{10}(\delta^*) - \sum \log_{10}(\lambda_i) \text{ Équation (1)}$$

Où  $\lambda_i$  est la « valeur de destruction biologique » partielle liée à chacun des facteurs explicatifs,  $\delta^*$  est le temps nécessaire à la première réduction décimale dans des conditions de référence. La « valeur de destruction biologique » correspond à la variation de la résistance bactérienne due à l'influence d'un facteur donné par rapport aux conditions de références. Pour la concentration en acide lactique non dissocié et en chlorure de sodium, la condition de référence correspond respectivement à 0 M et 0,5%, concentration optimale pour la survie ou minimale observée. Pour la température, la référence est fixée à 12°C proche de la température optimale de survie, et température à laquelle nous avons étudié l'influence des autres facteurs. Pour le pH, un pH de référence égal à 4,0 a été arbitrairement choisi afin qu'aux conditions de référence une inactivation soit bien observée pour *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*.

Les valeurs de destruction biologique concernent chaque facteur étudié mais ne rendent pas compte des interactions entre ces facteurs. Néanmoins cette approche modulaire laisse la possibilité d'ajouter de nouveaux modules prenant en compte les interactions éventuelles ou d'autre facteurs environnementaux. De plus, ce modèle possède un paramètre caractéristique ( $\delta^*$ ) jouant un rôle analogue à celui du  $\mu_{opt}$  des modèles cardinaux. En effet, selon l'approche modulaire ce paramètre correspond à la résistance des bactéries dans des conditions de référence données pour les facteurs considérés. Il prend en compte de manière globale tous les facteurs de l'environnement bactérien, autres que ceux qui sont intégrés sous forme des différentes « valeurs de destruction biologique », qu'ils soient de nature physique, chimique, ou biologique. Par contre, les facteurs qui ne sont pas pris en compte dans la modélisation, doivent être constants dans le temps et ne pas ou peu interagir avec les autres facteurs, pour qu'une telle approche soit valide.

# Références

- Augustin, J. C. 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 56: 29-51.
- Buchanan, R. L., M. H. Golden, R. C. Whiting, J. G. Phillips, et J. L. Smith. 1994. Nonthermal inactivation models for *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Science 59: 179-188.
- Le Marc, Y., V. Huchet, C. Bourgeois, J. Guyonnet, P. Mafart, et D. Thuault. 2002. Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. International Journal of Food Microbiology 73: 219-237.
- Lekkas, C., A. Kakouri, E. Paleologos, L. P. Voutsinas, M. G. Kontominas, et J. Samelis. 2006. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 °C. Food Microbiology 23: 268-276.
- Rosso, L., J. Lobry, S. Bajard, et J. Flandrois. 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. Applied Environmental Microbiology 61: 610-616.
- Whiting, R. C. 1993. Modeling bacterial survival in unfavorable environments. Journal of Industrial Microbiology 12: 240-246.
- Zwietering, M. H., T. Wijtzes, J. C. De Wit, et K. van't Riet. 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. Journal of Food Protection 55: 973-979.

# 2. <u>Modelling the non-thermal inactivation of Listeria</u> <u>monocytogenes or Salmonella typhimurium as a function of</u> <u>environmental factors: pH, lactic acid concentration, sodium</u> <u>chloride concentration and temperature</u>

Article soumis, AEM01593-06 Applied and Environmental Microbiology

#### Abstract

The non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* and of *Salmonella typhimurium* was investigated by a "one factor at a time" method. The studied stressing factors were the pH from 3.0 to 8.0, lactic acid concentration from 0 to 2 M, and sodium chloride concentration from 0 to 25% (wt/wt). The bacterial resistance against these stresses was modulated by incubation temperature from 4 to 35°C. Using the double Weibull model as primary model, we modelled the bacterial resistance as a function of the four factors following the biological destruction values concept which is the equivalent of an inactivation speed model following the gamma concept. For this first step of modular modelling approach, we assumed a multiplicative effect of the influence of each factor, and neglected the interaction between them. This way of modelling is parsimonious. Only two primary parameters required secondary modelling, and the global secondary model has only ten parameters for the four studied stresses. This work confirmed the use of the double Weibull model in order to describe non-thermal inactivation kinetics, and the evolution of bacterial resistance according to stress intensity.

#### 2.1 Introduction

While non-thermal inactivation phenomena were extensively studied by physiological or genetically experiments (1, 49), the quantification of non-thermal inactivation is less advanced compared to growth or thermal inactivation fields. This delay is partially due to the complexity of the shape of the survival curve changing according to the physiological state of bacterial population (44, 56, 57) and according to the intensity of stress (19, 21, 74, 83, 84). Within the framework of the bacterial growth, the totality of the primary parameters (for example: growth rate and lag time) are modelled as a function of environmental factors (63). On the other hand in the field of non-thermal inactivation, authors do not use primary parameters, but generally, from these, they deduct the effective time needed for a decrease of the population equal to 1, 2 or 4 decimal reductions ( $t_{1D}$ ,  $t_{2D}$  or  $t_{4D}$ ). From this value, they are able to built secondary models including the quantitative effect of some environmental factors (21, 65, 77, 84, 85). However, this rough response  $(t_{1D}, t_{2D} \text{ or } t_{4D})$  can not describe the evolution of the shape of survival curves with variations of considered factors. This type of modelling can not allow a precise simulation of the survival curve for a given stress. Nevertheless, some complete attempts of secondary modelling were achieved (46, 65). However, even in this case, the primary model implemented was not able to describe every type of inactivation curve shape and the proposed secondary modelling is mostly polynomial.

Polynomial models are the most frequently used secondary models in the area of predictive Microbiology. Such models present the advantage of integrating interactions

between explicative factors, but they generally lack of parsimony and of robustness, and may lead to absurd predictions (7, 42, 63). The integration of biological knowledge in the modelling is to be preferred. It can be realized by including parameters with biological interpretation (optimal temperature for bacterial growth) or by integrating each factor influence in specific functions which can be combined together. The so called "gamma concept" of Zwietering (89) illustrates this approach in the area of bacterial growth. It is based on an assumed multiplicative effect of combined modules ( $\gamma$ ), each of them reflecting quantitatively the degree of influence of the considered factor on the bacterial growth. This approach is similar to that which was involved by some authors in the field of thermal inactivation with modules reflecting the influence of temperature, pH, water activity on the bacterial resistance (29, 39, 62). In non-thermal fields, few models adopted this approach. Among these "one factor at a time" studies, different modules were proposed for pH (15), and for the total acid concentration (83) or for the undissociated acid form concentration (17, 18, 20).

The use of double Weibull distribution model was suggested in order to describe the adaptation of bacterial population against acid stress (26). The aim of this work is, by implementing the double Weibull model, to describe the inactivation curves under different types and conditions of stress (pH, acid lactic concentration, sodium chloride concentration and temperature), to model the influence of these factors on the different primary parameters according to a multiplicative approach.

# 2.2 Materials and methods

#### 2.2.1. Microorganism and inoculum preparation

The studied bacterial strains were *Salmonella enterica serovar typhimurium* isolated from brine (strain ADQP305 provided by ADRIA) and *Listeria monocytogenes* isolated from meat product (strain SOR100 provided by SOREDAB). The strains were stored at -80°C in medium composed by BHI (BIOKAR DIAGNOSTICS) broth supplemented with 50% (v/v) glycerol. The primary incubation of the vegetative cells was made in 100 ml of BHI broth in 250 ml flask at 37°C and shaken at 100 rotations per minute. After 8 hours of incubation, 1 ml of this culture was transferred into a second flask of 100 ml BHI broth. After 16 hours of incubation at 37°C, the bacterial population is in stationary phase since about 10 hours and the bacterial resistance of vegetative cells is high (26). The bacterial concentration is about  $4.10^9$  CFU.ml<sup>-1</sup> for *Salmonella typhimurium* and  $10^9$  CFU.ml<sup>-1</sup> for *Listeria monocytogenes*.

A sample (1 ml) of this culture was taken off and diluted in BHI broth, in order to get a concentration close to  $10^7$  CFU.ml<sup>-1</sup>. The inactivation medium was inoculated at the level of 1% (v/v) with this suspension.

# 2.2.2. Inactivation media

A basic BHI broth (BIOKAR DIAGNOSTICS) was appropriately modified in order to generate the stress leading to the inactivation. The pH was adjusted with hydrochloric acid or sodium hydroxide, the broth was modified by addition of lactic acid (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland) or sodium chloride (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland).

To avoid any change in the constituents of the modified broth by heating, it was filtered on a sterile membrane of pores of 0.22  $\mu$ m diameter (Steritop system, Millipore

Corporation, Billerica, MA, U.S.A.). Then, 100 ml of this broth was dispended sterilely in culture flasks (250 ml) which were sterilized by autoclaving (121.1°C 20 min), closed with a cover that allowed gaseous exchange and precooled or in incubator shaker. Micro-organisms were inoculated in 100 ml of modified BHI broth to approximately 10<sup>5</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>. The inactivation flasks were put in an incubator shaker (100 rpm) at appropriate temperature. The pH of the inactivation medium was measured before the inoculation and after the last numeration of survivors. No difference was pointed out.

#### 2.2.3. Numeration of survivors

Survivors were enumerated immediately after inoculation and at appropriate time intervals by surface-plating cultures on BHI agar (BIOKAR DIAGNOSTICS) using a Spiral Plater (WASP1, Don Whitley, Shipley, West Yorkshire, UK), until no survivors could be detected. When dilutions were necessary for the enumeration, 0.5 ml of the suspension was taken off and diluted in the same modified BHI broth than the inactivation media. According to the conditions of inactivation, the enumeration was made after variable incubation times (24 to 72 hrs) at 37°C.

# 2.2.4. Experimental design

A "one factor at a time" approach was implemented with at least ten levels of pH, lactic acid concentration and sodium chloride concentration. This approach was chose in order to observe the general bacterial response linked to each studied stress. A first experimental design (i) was built to study the influence of each factor individually without interaction. A second experimental design (ii) was built to study the influence of a factor in larger range and thus in interaction with another factor. The inactivation was studied for each factor by two "one factor at a time" studies as follows (for example see figure 1).

For pH:

- (i) from 3.0 to 4.0 in BHI acidified with hydrochloric acid.
- (ii) from 3.0 to 8.0 using the sodium chloride concentration as limiting factor for bacterial growth (10 % or 12 % (wt/wt) for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* respectively).

For lactic acid concentration:

- (i) from 0.4 to 2.0 M in BHI, pH of inactivation media was adjusted to 5.2 with hydrochloric acid or sodium hydroxide (equivalent to a range of 16 to 100 mM of the undissociated form of lactic acid).
- (ii) from 0.0 to 0.1 M for *Salmonella typhimurium* and to 0.6 M for *Listeria monocytogenes* in BHI at pH adjusted to 4.0 with hydrochloric acid (equivalent to a maximal concentration of the undissociated form of lactic acid of 40 and 200 mM for *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* respectively).

For sodium chloride concentration:

- (i) from 8 % or 10 % (wt/wt), respectively for *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, to 25 % (wt/wt) (equivalent to a range of water activity from 0.780 to 0.940 or 0.910). The pH of modified BHI was adjusted to 7.0.
- (ii) from 0.5 to 25.0 % (wt/wt) at pH adjusted to 4.0 (equivalent to a range of water activity from 0.780 to 0.996).

The inactivation flasks were put in an incubator shaker (100 rpm) at 12°C in order to study the influence of pH, lactic acid concentration and sodium chloride concentration. The upper limit of the first plan range and the level of limiting factor were chosen slightly less than the minimum value allowing the growth at 12°C in BHI.

For the study of the influence of temperature on bacterial resistance, different incubation temperatures were investigated in a range from 4 to 35°C for three specific stresses. Each type of stress was obtained as follows:

- (i) pH stress: exposure to BHI at pH adjusted to 3.4.
- (ii) Acid stress: exposure to BHI at pH adjusted to 5.2 and lactic acid concentration adjusted to 1.2 M.
- (iii) Osmotic stress: exposure to BHI at pH adjusted to 7.0 and sodium chloride concentration of 18 % and 20 % respectively for *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*.



Figure 1 Experimental design to study the influence of pH, undissociated lactic acid concentration [AH] and sodium chloride concentration [NaCl] %(wt/wt) on the inactivation of <u>Salmonella typhimurium</u>

#### 2.2.5. Fitting of survival kinetics and evaluation of model

The double Weibull model was used as primary model (26). It can be written as follows:

$$N(t) = \frac{N_0}{1+10^{\alpha}} \left[ 10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^{p} + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^{p}} \right]$$
(1)

Where *N* is the number of survivors,  $N_0$  is the inoculum size, *t* the time, *p* a shape parameter and  $\delta$  the time for the first decimal reduction. Indices 1 and 2 are linked to the two subpopulations. Subpopulation 1 is assumed to be more sensitive to stress than subpopulation 2 ( $\delta_1 < \delta_2$ ). The parameter  $\alpha$  is the logit transformation of the fraction of the subpopulation 1 in the population.

Primary and secondary models can be expressed as follows:

$$Y_i = f(x_i, \theta) + \varepsilon_i \tag{3}$$

Where  $Y_i$  is the observed response as the decimal logarithm of N or the decimal logarithm of  $\delta$ , f is the regression function (equation 1 for primary modelling),  $x_i$  is the explicative factor. Vectors of parameters of models  $\theta$  were estimated by minimization of the sum of square of the residual values ( $\varepsilon_i$ ) defined by:

$$C(\theta) = \sum_{i=1}^{n} \left( Y_i - f(x_i, \theta) \right)^2$$
(9)

Where n is the number of data. The minimum  $C(\theta)$  values were computed by nonlinear fitting module (lsqcurvefit, MATLAB 6.1, Optimization toolbox, The Math-works). Confidence intervals of the estimated parameters were obtained by using traditional methods based on a linear approximation (nlparci, MATLAB 6.1, The Math-works).

The fit of the models was compared using the Akaike Information Criterion (AIC) (3)

:

 $\varepsilon_i$ .

$$AIC = -2.\ell(\theta) + 2.p \tag{10}$$

Where *p* is the number of parameters of the model, and  $\ell(\theta)$  is the log-likelihood. In the case of Gaussian observations, the least square estimator of  $\theta$  is also the maximum likelihood estimator (51). The logarithm of the likelihood is generally used instead of the likelihood itself and it is defined as follows:

$$\ell(\theta) = -\frac{n}{2} \cdot \log(2\pi) - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n} \left[ \log(Var(\varepsilon_i)) + \frac{(Y_i - f(t_i, \theta))^2}{Var(\varepsilon_i)} \right]$$
(11)

Herein *n* is the number of points of the curve, and  $Var(\varepsilon_i)$  the variance of the residual

The AIC criterion permits to compare models on the goodness of fit and the parsimony (3, 64). A great number of parameters or a poor quality of fit (small log-likelihood value) corresponds to a high value of AIC. The best model has small AIC value.

The likelihood ratio test was used in order to test whether q parameters of the vector  $\theta$  are identical (51). Let  $\theta_H$  be the estimation of  $\theta$  under the constraint of the equality of the

parameters and  $\theta_A$  be the unconstraint estimation of  $\theta$ . In the homogeneous variance situation, the statistic test is:

$$S_L = n \ln(C(\theta_H)) - n \ln(C(\theta_A))$$
(5)

If the *q* parameters are equal, the  $S_L$  value will be small. When *n* tends to infinity, it can be shown that the limiting distribution of  $S_L$  is a  $\chi^2$  distributed with degrees of freedom equal to the difference in dimensionality of  $\theta_A$  and  $\theta_H$ .

#### 2.3 <u>Results</u>

#### 2.3.1 <u>Behaviour of parameters α and p</u>

The profile of the curve varies according to the physiological state of bacterial cells, but also according to the intensity of stress. The double distribution model is able to fit all types of typical survival curves which can be observed (24, 41, 88). The parameters of the double Weibull model are graphically interpretable as shown as an example, in the case of a biphasic curve with latency, figure 2. It was fitted on each set of kinetic data in order to obtain the estimates of the five primary parameters ( $N_0$ ,  $\alpha$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ , p).  $\delta_1$  and  $\delta_2$  values reflect the resistance of the subpopulation 1 and 2 respectively to stress. The parameter  $\alpha$  is the logit transformation of the fraction (f) of the subpopulation 1 in the population, the most frequently used parameter (24, 84, 88). If the fraction (f) gives the ratio of the more sensitive subpopulation 1 (less resistant to stress) and the logarithm of the initial size of subpopulation 1 (less resistant to stress) and the logarithm of the initial size of subpopulation 1, the ratio of the two sub-populations. The more resistant the population is, the closer to zero the f value is, which corresponds to a  $\alpha$  value tending to negative infinity.



Figure 2 Diagram of survival model based on the double Weibull distribution of the resistance. (—) microbial population; (--) subpopulation 1; (— —) subpopulation 2. With subpopulation 1 representing bacteria the less resistant cells, and the subpopulation 2 representing the more resistant cells.

144 sets of kinetic data of inactivation were acquired for *Listeria monocytogenes* with a mean of 43.7 enumerations for each curve and 136 sets of kinetic data were acquired for Salmonella typhimurium with a mean of 43.1 enumerations. The estimated value of  $\alpha$  was independent of the environmental factors and their median values were 2.23 and 1.14, which is equivalent to f=99.4% and f=93.2% for Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium respectively. This parameter is dependant on the physiological state of the inoculum (26). The quality of model fit was good, but aberrant estimation of  $\alpha$  were observed, like negative value or higher than the  $N_0$ . It was decided to estimate a single overall couple  $(N_0, \alpha)$  value for the kinetic data which were obtained from the same inoculum preparation. Seven inoculum preparations were made for the two species. With the 144 kinetic curves of *Listeria monocytogenes*, 446 parameters (7  $N_0$ , 7  $\alpha$ , 144  $\delta_1$ , 144  $\delta_2$ , 144 p) were then estimated instead of 720 parameters. For Salmonella typhimurium, this simplification led us to estimate 422 parameters (7  $N_0$ , 7  $\alpha$ , 136  $\delta_1$ , 136  $\delta_2$ , 136 p) instead of 680. The estimated  $\alpha$  values ranged from 0.62 to 2.98 with a median value close to 2.10 (which corresponds to f ratios from 80.6% to 99.9%) for Listeria monocytogenes and ranged from 0.28 to 1.52 with a median value close to 1.20 (which corresponds to f ratios from 65.5% to 97.1%) for Salmonella typhimurium.

The p value reflects the shape of the survival curve and its value is assumed to be independent of the stress intensity and on the physiological state of the bacterial population when the simple or the double Weibull model is implemented (26, 28, 34, 70, 82). The p median values were 1.90 and 2.27 for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* respectively. No clear evolution of the p value as functions of environmental factors was observed, and for a same stress very different values, lower than 1 and higher than 3, could be estimated (figure 3). These unstable estimations were due to the strong structural correlations between parameters of the model of Weibull (28, 61). We decided to estimate a single p value for each species. The simplification of the model was validated for only 41% of cases for *Listeria monocytogenes* and 48% for *Salmonella typhimurium*. However, even when statistical criteria rejected the simplification of a single p-value, the flexibility of the Weibull model allowed a good description of all survival curves. The estimated p values were equal to 1.95 and 2.29, close to median values.

After these simplifications, the estimated parameters were for the 144 kinetics of *Listeria monocytogenes* (7  $N_0$ , 7  $\alpha$ , 144  $\delta_1$ , 144  $\delta_2$ , 1 p) and for the 136 kinetics of *Salmonella typhimurium* (7  $N_0$ , 7  $\alpha$ , 136  $\delta_1$ , 136  $\delta_2$ , 1 p). The model lost quality of fit, the root mean square error was 0.199 instead 0.145 of and 0.188 instead of 0.132, the Akaike information criterion increased less than 10% due to the reduction of 60% of the parameters numbers. Moreover, simplifications limited the number of aberrant estimations of  $N_0 \alpha$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  or p. This method of fit allowed the secondary modelling of only the  $\delta_1$  and  $\delta_2$  parameters which reflects the resistance of the bacterial population at given conditions of stress.



Figure 3 Estimated p value as function of pH, undissociated lactic acid concentration, sodium chloride concentration and temperature for Listeria monocytogenes ( $\circ$ ) and Salmonella typhimurium (+). The overall estimated p values for Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium are represented by grey and black lines respectively.
#### 2.3.2 Influence of pH on bacterial resistance

The resistance is quantified by  $\delta_1$  for the less resistant subpopulation and by  $\delta_2$  values for the more resistant subpopulation. The evolution of the estimated values of  $\delta_1$  and  $\delta_2$  as functions of pH presented the same shape for the two bacterial species (figure 4). Like observed in other works (17, 80, 84), an optimum pH of survival was observed between 5.5 and 6.0. The sensitivity of the studied microorganisms varied with the pH value. The more distant from the optimum the pH was, the more strengthened the sensitivity to variation of pH was. Moreover the curve was not symmetric and the sensitivity was different for acidic pH and basic pH. Based on a Bigelow model type and according to our observations, we chose to describe empirically the evolution of  $\delta_1$  and  $\delta_2$  by the following cubic model:

$$\log_{10}(\delta) = \begin{cases} \log_{10} \delta_{pH_{opt}} - \left(\frac{pH - pH_{opt}}{z_{pH_{acid}}}\right)^3 & pH \le pH_{opt} \\ \log_{10} \delta_{pH_{opt}} - \left(\frac{pH - pH_{opt}}{z_{pH_{basic}}}\right)^3 & pH > pH_{opt} \end{cases}$$
(6)

Where  $\delta$  is the first decimal reduction time of subpopulation 1 or 2 (sensible or resistant) for a stress at a given pH;  $\delta_{pH opt}$  is the first reduction time of subpopulation 1 or 2 for a stress at optimal pH ( $pH_{opt}$ ) for survival.  $Z_{pH}$  is the difference of pH from  $pH_{opt}$ , which leads to a tenfold reduction of  $\delta_{pH opt}$  value. If the pH level is lower than to  $pH_{opt}$ ,  $Z_{pH}$  values are called "acid" and for the inverse case "basic".

The estimated  $\delta$  values of the two studied species are represented figure 4 and the estimated parameters are presented table 1. For a lower level of sodium chloride concentration, the  $Z_{pH acid}$  was lower, particularly for *Salmonella typhimurium*. This difference of estimates was a sign of the interaction which exists between the pH and sodium chloride concentration factors.

		Listeria mo	nocytogenes	Salmonella	typhimurium	
[NaCl]		$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2(h)$	
	$L_{\alpha\alpha}(\delta)$	3.03	3.06	2.86	3.17	
	$Log_{10}(O_{pH opt})$	[2.91; 3.15]	[2.95; 3.18]	[2.76; 2.96]	[3.06; 3.28]	
	7	-1.60	-1.82	-1.93	-1.94	
12 %	∠pH acid	[-1.83;-1.36]	[-2.10; -1.54]	[-2.08; -1.77]	[-2.08; -1.79]	
$12\% \begin{bmatrix} 2.91; 3.15 \\ -1.60 \\ -1.82 \\ -1.93 \\ -1.60 \\ -1.82 \\ -1.93 \\ -$	$Z_{pH \ basic}$	3.57	3.87	1.76	2.52	
		[2.78; 4.36]	[2.90; 4.84]	[1.54; 1.99]	[1.97; 3.07]	
	nH	5.	04	5.	89	
	6.09]					
	$Log_{1}(\delta - )$	3.10	3.25	3.63	3.54	
0 50/	$Log_{10}(O_{pH opt})$	[2.92; 3.27]	[3.08; 3.42]	[3.43; 3.83]	[3.35; 3.73]	
0.370	7	-1.70	-1.72	-2.21	-2.40	
	$Z_{pHacid}$	[-1.94; -1.45]	[-1.97; -1.47]	[-2.37; -2.05]	[-2.60; -2.20]	
Num	ber of kinetics	3	3	3	5	
Root m	ean square error	0.1	29	0.125		

Table 1 Estimates of parameters of the pH model and confidence intervals in the square brackets ( $\alpha$ =0.05) for <u>Listeria monocytogenes</u> and <u>Salmonella typhimurium</u>.



Figure 4 Influence of pH on the  $\delta_1$  (•) and  $\delta_2$  (°), and estimates of  $\delta_1$  (--) and  $\delta_2$  (--) at 0.5 % NaCl (**1**) and 10 % or 12 % (wt/wt) (**1**) for respectively <u>Listeria monocytogenes</u> (a) and <u>Salmonella typhimurium</u> (b).

#### 2.3.3 Influence of acid lactic concentration on bacterial resistance

The evolution of the bacterial resistance was expressed by other workers as a linear function of the square root of the undissociated acid form (17, 18, 20). The evolutions of  $\delta_I$  and  $\delta_2$  as functions of undissociated lactic acid concentration were then modelled as follows:

$$\log_{10}(\delta) = \log_{10}(\delta_{\max}) - \left(\frac{[AH]}{z_{AH}}\right)^{\frac{1}{2}}$$
(7)

Where  $\delta$  is the first decimal reduction time observed for a given undissociated lactic acid concentration ([AH]);  $\delta_{max}$  is the first decimal reduction time observed for an undissociated lactic acid concentration which is equal to 0 M; and  $Z_{AH}$  is the addition of undissociated lactic acid concentration, which leads to a tenfold reduction of  $\delta_{max}$  value.

The estimated  $\delta$  values of the two studied species as a function of undissociated lactic acid concentration are represented figure 5 and the estimated parameters are presented table 2. When the acid stress was strengthened by a low pH, the interaction between these factors was expressed by a decline of  $Z_{AH}$  for *Salmonella typhimurium* (higher sensibility to undissociated lactic acid concentration at low pH) and by an increase of  $Z_{AH}$  for *Listeria monocytogenes* (lower sensibility to undissociated lactic acid concentration at low pH).

		Listeria mon	ocytogenes	Salmonella	typhimurium		
pН		$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)		
	$L_{\alpha\alpha}(\delta)$	2.86	3.05	3.08	3.17		
4.0	$Log_{10}(o_{max}) = [2.72; 3.00] = [2.92; 3.00] =$	[2.92; 3.19]	[2.88; 3.28]	[2.97; 3.37]			
4.0	$\mathbf{Z}$ (mM)	117.38	70.26	17.49	20.94		
	$Z_{AH}$ (IIIIVI)	[67.88; 166.87]	[47.34; 93.19]	[9.91; 25.07]	[11.02; 30.86]		
	$L_{\alpha\alpha}(\delta)$	4.17	4.48	3.77	3.43		
5 2	$Log_{10}(O_{max})$	$\begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	[2.98; 3.87]				
5.2	$\mathbf{Z}_{m}$ (mM)	15.87	21.21	50.22	182.83		
	$Z_{AH}$ (IIIIVI)	[7.39; 24.35]	[8.11; 34.31]	[10.01; 90.43]	[-96.46; 462.12]		
Nur	nber of kinetics	3.	5	30			
Root r	nean sauare error	0.1	87	0 205			

Table 2 Estimates of parameters of the acid model and confidence intervals in the square brackets ( $\alpha$ =0.05) for Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium.



Figure 5 Influence of undissociated lactic acid concentration ([AH]) on the  $\delta_1$  (•), and  $\delta_2$  ( $\circ$ ) and estimated values of  $\delta_1$  (-) and  $\delta_2$  (-) at pH=7 ( $\blacksquare$ ) and pH=4 ( $\blacksquare$ ) for Listeria monocytogenes (a) and Salmonella typhimurium (b).

# 2.3.4 <u>Influence of sodium chloride concentration on bacterial</u> <u>resistance</u>

The bacterial behaviour with respect to sodium chloride concentration was different according to the range of concentration. For low concentrations the addition of sodium chloride increased the rate of inactivation, while for high concentrations, the same addition had low or no effect. In order to describe this characteristic evolution of the resistance against sodium chloride addition, an equation previously published as a primary model was adapted (4):

$$\log_{10}(\delta) = \log_{10}\left(\delta_{[NaCl]_{opt}}\right) + \log\left[\left(1 - 10^{-\Delta}\right)10^{-\left(\frac{[NaCl]_{[NaCl]_{opt}}}{Z_{NaCl}}\right)^{2}} + 10^{-\Delta}\right]$$
(8)

Where  $\delta$  is the first reduction time observed at a given sodium chloride concentration,  $\delta_{[NaCl] opt}$  is the first decimal reduction time observed at the optimal sodium chloride concentration for survival. This sodium chloride concentration corresponds to the minimal concentration in BHI ([NaCl]<sub>opt</sub> = 0.5 % (wt/wt)).  $Z_{NaCl}$  is the addition of sodium chloride concentration (wt/wt), which leads to a tenfold reduction of  $\delta_{max}$  value;  $\Delta$  is the maximal decimal reduction of the resistance, caused by a sodium chloride addition.

According to the equation (8), the resistance tend toward an asymptote equals to  $\log_{10}(\delta_{[NaCl] opt})-\Delta$  when the sodium chloride concentration aims to infinity. This phenomenon was observed for the  $\delta_2$  of the two studied species, and the  $\delta_1$  of *Salmonella typhimurium*, whereas for *Listeria monocytogenes* over 18 % NaCl (wt/wt) an addition of sodium chloride decreased the resistance of the most sensitive subpopulation ( $\delta_1$ ). The fitted model and the estimated parameters of the sodium chloride model are presented figure 6 and tables 3 and 4. For *Listeria monocytogenes* at pH = 7.0, no effect might be observed for low sodium chloride concentration, we were not be able to observe  $\log_{10}(\delta_{[NaCl] opt})$  and  $Z_{NaCl}$  values. Instead of estimating these values, it was preferred to estimate  $\log_{10}(\delta_{[NaCl] opt})-\Delta$ . The interaction between the pH and the sodium chloride concentration was reflected by decrease of  $Z_{NaCl}$  and  $\Delta$  values with the decrease of pH.

		Listeria monocytogenes					
pН		$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2(\mathbf{h})$				
	$Log_{10}(\delta_{INaCII opt})$	3.05	3.17				
		[2.89; 3.21]	[3.00; 3.35]				
4 0	Δ	0.55	0.44				
1.0	-	[0.35; 0.75]	[0.24; 0.65]				
	$\mathbf{Z}_{a} = (0_{a} (\mathbf{n}_{a} + \mathbf{n}_{b}))$	6.04	5.16				
	$Z_{NaCl}$ (70 (WI/WI))	[3.29; 8.79]	[2.27; 8.04]				
7.0		2.51	2.84				
7.0	$Log_{10}(o_{[NaCl] opt})-\Delta$	[2.39; 2.64]	[2.72; 2.97]				
Ν	lumber of kinetics	38	8				
Root mean square error		0.1	94				

Table 3 Estimates of parameters of the NaCl model and confidence intervals in the square brackets ( $\alpha$ =0.05) for <u>Listeria monocytogenes</u>

		Salmonella	typhimurium
рН		$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)
	$L_{\alpha\alpha}$ (S )	3.01	3.14
	$Log_{10}(O_{[NaCl] opt})$	[2.91; 3.11]	[3.05; 3.24]
4.0	٨	1.17	0.82
4.0	$\Delta$	[1.03; 1.30]	[0.68; 0.96]
	<b>7</b> (0/ ( $(1,1,1,1,1,1,1,1,$	6.35	9.53
	$Z_{NaCl}$ (% (Wl/Wl))	[5.34; 7.36]	[7.08; 11.99]
	$L_{\alpha\alpha}$ (S )	3.72	3.59
	$LOg_{10}(O[NaCl] opt)$	[3.25; 4.20]	[2.95; 4.23]
7.0	٨	2.17	1.04
7.0	$\Delta$	[1.72; 2.62]	[0.45; 1.63]
	7	9.96	11.91
	$\boldsymbol{Z}_{NaCl}$ (70 (Wl/Wl))	[8.09; 11.82]	[6.46; 17.36]
Number of kinetics			44
Root mean square error		0.	151

Table 4 Estimates of parameters of the NaCl model and confidence intervals in the square brackets ( $\alpha$ =0.05) for <u>Salmonella typhimurium</u>



Figure 6 Influence of sodium chloride concentration on the  $\delta_1$  (•) and  $\delta_2$  (°), and estimated values of  $\delta_1$  ( – –) and  $\delta_2$  (—) at pH=7 (•) and pH=4 (•) for <u>Listeria monocytogenes</u> (a) and <u>Salmonella typhimurium</u> (b).

## 2.3.5 Influence of temperature on bacterial resistance

The effect of the temperature of incubation differed according to the applied stress. For a pH stress (pH= 3.4), an optimal survival temperature was observed near 11°C for the two studied species. For the sodium chloride stress (18% or 20% NaCl, pH=7.0) or the acid lactic stress (1.2 M lactic acid and pH=5.2, 52.5 mM of undissociated lactic acid), the lower the temperature was and the higher the resistance was. The bacterial sensitivity to stress (slope of the curve log( $\delta$ ) versus temperature) was increased at warm temperature. An elevation of the incubation temperature from 25°C to 30°C decreased more the bacterial sensitivity seemed to be constant. On account of this pattern, we tried to describe the influence of temperature on the bacterial resistance against stress by a linear function for low temperature connected with a tangent parabola for high temperature. The two equations have the same derivative at the junction point. We arbitrarily chose 12°C as the reference temperature of incubation because other investigated factors were studied at this temperature. The temperature influence was modelled as followed:

$$\log(\delta) = \begin{cases} \log(\delta^{*}) - \frac{2 \cdot (T_{c} - T_{opt})}{Z_{T}^{2}} \cdot (T - T^{*}) & T \leq Tc \\ \log(\delta^{*}) + \frac{(T_{c} - T_{opt}) \cdot (2T^{*} - T_{c} - T_{opt})}{Z_{T}^{2}} - \left(\frac{T - T_{opt}}{Z_{T}}\right)^{2} & T > Tc \end{cases}$$
(9)

Where  $\delta$  is the first decimal reduction time observed at a given temperature (*T*);  $\delta^*$  is the first decimal reduction time observed at the reference temperature  $T^*$  (fixed to 12°C);  $T_{opt}$  is the optimal temperature for survival (only observed for pH stress);  $T_c$  is the junction temperature between the linear function and the parabola.  $Z_T$  is the variation of temperature from  $T_{opt}$ , which leads to a tenfold reduction of  $\delta^*$  value.

For each stress and for  $\delta_1$  and  $\delta_2$  values, the set of parameters ( $\log_{10}(\delta^*)$ ),  $T_c$ ,  $T_{opt}$ ,  $Z_T$ ) was estimated. In order to have a lighter model, four simplifications have been made, leading to a number of estimated parameters decreasing from 24 to 9. Regarding the pH stress, an optimum of temperature is observed, so that the influence of temperature of incubation could be reflected by only the parabolic part of the model. It was decided to fix the  $T_c$  value for pH stress to a temperature lower than the minimum observed temperature, i.e.  $T_c=0^{\circ}C$ . Towards the three different types of stress and for  $\delta_1$  and  $\delta_2$  resistances, a single overall value of  $Z_T$  and  $T_{opt}$  could be estimated independently of the type of stress or of the subpopulation. And in the case of acid lactic stress or osmotic stress a single  $T_c$  value swere equal to 19.69 for *Listeria monocytogenes* and to 23.41 for *Salmonella typhimurium*. The fitted model and the estimated parameters are presented figures 7, 8 and table 5.

		Listeria mo	onocytogenes	Salmonella	typhimurium		
stress		$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)		
nII	$L_{\alpha\alpha}$ ( $s^*$ )	2.50	2.60	2.56	2.72		
рп	$\log_{10}(o)$	[2.34; 2.66]	[2.44; 2.76]	[2.41; 2.71]	[2.56; 2.87]		
Agid	$L_{\alpha\alpha}(\delta^*)$	2.22	2.60	2.64	2.81		
Aciu	$\log_{10}(\sigma)$	[2.10; 2.33]	[2.48; 2.71]	[2.52; 2.76]	[2.70; 2.93]		
$N_{0}C1$	$I_{\alpha\alpha}(\delta^*)$	2.09	2.68	1.64	2.62		
INACI	$Log_{10}(\sigma)$	[1.97; 2.2]	[2.56; 2.80]	[1.52; 1.76]	[2.50; 2.73]		
$\overline{Z}_{-}(^{\circ}C)$		22	2.28	21	.89		
	$Z_T(C)$	[18.82	2; 25.74]	[18.46; 25.32]			
	$T (\mathcal{O}C)$	1	0.31	11.86			
	$\Gamma_{opt}$ ( C)	[6.59	; 14.04]	[8.34;	15.38]		
	$T (\mathcal{O}C)$	1	9.94	19	.79		
	$I_c(C)$	[16.30	); 23.58]	[16.39;	23.18]		
Nu	mber of kinetics		55	52			
Root	mean square error	0.	.232	0.221			
	(a)		(b)				

Table 5 Estimates of parameters of the temperature model and confidence intervals in the square brackets ( $\alpha$ =0.05)



Figure 7 Influence temperature on the  $\delta_1$  (•) and  $\delta_2$  ( $\circ$ ) of <u>Listeria monocytogenes</u>, and estimated values of  $\delta_1$  (-) and  $\delta_2$  (-) for different stress : (a) pH=3.4, (b) pH=5.2 and 1.2 *M* of lactic acid and (c) 20 % (wt/wt) of sodium chloride.



Figure 8 Influence temperature on the  $\delta_1$  (•) and  $\delta_2$  (•) of <u>Salmonella typhimurium</u>, and estimated values of  $\delta_1$  (--) and  $\delta_2$  (--) for different stress : (a) pH=3.4, (b) pH=5.2 and 1.2 *M* of lactic acid and (c) 18 % (wt/wt) of sodium chloride.

#### 2.4 Discussion

By setting as model bacteria *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* with very different physiological pathways, we expected to develop robust models. It is recognized that bacterial resistance is different according to the nature of the acid (2, 25, 78). The separated integration of the two different effects, protons and undissociated form, is necessary in the modelling (17, 18, 20). Acidification by an inorganic acid allows the observation of protons effect (30). The increase of weak acid concentration in environmental media has not the same effect. The bacterial wall is permeable to the undissociated form of weak acid (AH). These are going to dissociate in the cytoplasm according to their pKa, leading to a decrease of the internal pH by the liberation of protons, an increase of the cellular turgescence and an inhibition of the metabolic ways by the accumulation of the anionic form (A<sup>-</sup>) (10, 27, 36, 54). The estimated optimal pH of survival of *Listeria monocytogenes* and Salmonella typhimurium are close to those previously observed even slightly acid (8, 17, 35, 38, 48, 69, 75, 84). The Z<sub>pH acid</sub> and Z<sub>pH basic</sub> reflects the different bacterial sensitivity related to physiological mechanisms used in order to alkalinize or acidify the cytoplasm or the media (10, 14, 37, 47, 72). The equation (7) reflects the killing effect of the protonated lactic acid on Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium. Previous works proposed this type of model describing the resistance or the necessary time for four decimal reductions as a linear function of the square root of undissociated acid concentration for Listeria monocytogenes and lactic acid or citric acid or malic acid (17, 18, 20). Whereas this kind of model seems to be robust, it might under-estimate the bacterial resistance for low concentration close to 5mM of protonated acid. These low concentrations seem to have a protective effect on survival for acetic, malic, citric or lactic acid (13).

The influence of the sodium chloride concentration on the bacterial inactivation can be divided in two fields as described by the equation (8). Very low water activity (0.30 to 0.70) which were not investigated in this work, might have protective effects (12, 79). From 0.70 to 0.90, variation of water activity or sodium chloride addition does has few effect (33, 58). However from 1.00 to 0.90, the decrease of water activity has a clear killing effect. The transition between low and high sensitivity is situated at about 10% of sodium chloride (wt/wt) in our work, which corresponds to a value of water activity of about 0.9, which is

close to values observed in other works (46, 67, 76, 84). The high sensitivity reflected by the  $Z_{[NaCl]}$  values is also close to the sensitivity which can be estimated from data of Miller (67).

Inside the investigated range, the temperature was not responsible for the bacterial inactivation but it appeared to be an important factor to modulate the rate of inactivation. In food or in synthetic media, an optimum for pathogens survival was already observed near 10°C (21, 50, 53, 66, 84). In complex media, this could be explained by the development of yeast which modified the food and created favourable conditions for survivals (58). Our own observations showed, according to the origin of the stress, that the resistance was differently modulated. For an osmotic stress or a weak acid stress, optimum temperature for survival was not observed, while an optimum close to 10°C for pH stress was observed. The increased resistance at low temperature is the result of multiple mechanisms of adaptation: modification of the bacterial wall composition (6, 23, 73), modification of proteins and DNA configuration (52), cold shock proteins expression (1, 9, 59, 71, 81), and accumulation of compatible solutes (5, 11, 16, 31, 32, 40, 43, 55, 68, 86). The similitude of the bacterial response against osmotic stress and weak acid stress may be due to accumulation in the cell of compatible solutes. The accumulation of compatible solutes is enhanced at low temperature and increase the bacterial resistance to salt and unprotoned acid form (A<sup>-</sup>) accumulation. Regardless of the stress origin, the equations (9) and (15) are able to describe the effect of temperature. If an optimal survival temperature is observed, T<sub>c</sub> value is necessarily lower than the minimum observed temperature. While the bacterial survival response was different for the different stress, as the sensitivity to warm temperature was the same ( $Z_T = 25^{\circ}C$ ).

From the point of view of modelling, the double Weibull primary model allowed a secondary modelling involving only two parameters ( $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ). This model discriminates the less resistant bacteria from most resistant. This separation is important because, as we observed, the most resistant subpopulation presents also a lower sensitivity to varied stress intensity. In a safety way, the optimization of process or of formulation could be made by taking the most resistant subpopulation into account, that can not be done with other primary models. The developed secondary modelling was purely empiric but it incorporated biological knowledge and an observation of two different physiologically species as *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. However, the use of this model requires preliminary studies or verification in order to confirm that no growth could be observed at conditions of predictions. It can easily be done with probabilistic or deterministic model of bacterial growth (for review see (63)).

According to the concept of "biological destruction values" used in thermal processes (60), a global model neglecting interactions can be written as follows :

$$\log_{10}(\delta) = \log_{10}(\delta^*) - \sum \log_{10}(\lambda_i) \qquad (10)$$

Where  $\lambda_i$  is the partial biological destruction value related to each explicative factors (i),  $\delta^*$  is the first reduction time observed at reference conditions of factors which are taken into account. The global model can be expressed differently:

$$\frac{1}{\delta} = \frac{1}{\delta^*} \prod \lambda_i \quad (11)$$

Such a structure is in similar to the Zwietering gamma concept (89) which was applied to the specific rate of growth.

According to the equations(6), (7), (8) and (9), the biological destruction values related to pH, undissociated acid lactic concentration, sodium chloride concentration and temperature are defined as follows:

$$\log_{10}(\lambda_{pH}) = \begin{cases} \left(\frac{pH - pH_{opt}}{z_{pH_{acide}}}\right)^{3} - \left(\frac{pH^{*} - pH_{opt}}{z_{pH_{acide}}}\right)^{3} \quad pH \le pH_{opt} \\ \left(\frac{pH - pH_{opt}}{z_{pH_{basique}}}\right)^{3} - \left(\frac{pH^{*} - pH_{opt}}{z_{pH_{basique}}}\right)^{3} \quad pH > pH_{opt} \end{cases}$$
(12)  
$$\log_{10}(\lambda_{[AH]}) = \left(\frac{[AH]}{z_{AH}}\right)^{\frac{1}{2}}$$
(13)  
$$\log_{10}(\lambda_{[NaCl]}) = \log\left[\left(1 - 10^{-\Delta}\right) \cdot 10^{-\left(\frac{[NaCl] - 0.5}{Z_{NaCl}}\right)^{2}} + 10^{-\Delta}\right]$$
(14)  
$$\log_{10}(\lambda_{T}) = \begin{cases} \frac{2(T_{c} - T_{opt})}{Z_{T}^{2}} \cdot (T - T^{*}) & T \le Tc \\ \left(\frac{T - T_{opt}}{Z_{T}}\right)^{2} - \frac{(T_{c} - T_{opt})(2T^{*} - T_{c} - T_{opt})}{Z_{T}^{2}} & T > Tc \end{cases}$$
(15)

The  $\delta^*$  values is the first decimal reduction time observed at the reference conditions of treatment (pH<sup>\*</sup> = 4, [AH]=0 mM, [NaCl]=0.5 %, T<sup>\*</sup>=12°C). The reference pH (denoted pH<sup>\*</sup>) was arbitrarily fixed at pH=4.0 and not pH=7.0 because of the necessity of choosing a reference pH belonging to the bacterial inactivation range.



Figure 9 Estimated values  $\delta$  versus observed values for <u>Listeria monocytogenes</u> (a) and <u>Salmonella typhimurium</u> (b),  $\delta_1$  (•) and  $\delta_2$  ( $\circ$ )

Characteristic values of $Log_{10}(\delta)$	$\delta_{I}$	(h)	$\delta_2$ (	(h)					
Leg (S	2.9	93	3.1	0					
LOg <sub>10</sub> ( <i>O<sub>pH*</sub></i> , 0 [AH], 0.5% [NaCl],T*)	[2.83]	[3.04]	[2.99;	3.21]					
I (S	3.9	95	3.92						
$Log_{10}(O_{pH}=5.2, 0 [AH], 0.5\% [NaCl], T^*)$	[3.44]	(4.46]	[3.41;	4.43]					
I (S	2.0	09	2.69						
$Log_{10}(o_{pH=7.0, 0} [AH], 20\% [NaCl], T^*)$	[1.98]	[2.19]	[2.58;	2.80]					
Parameters characterising	Simple	e stress	Double	stress					
bacterial sensitivity	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)					
- II			5.26						
pH <sub>opt</sub>		[4.8	33;5.68]						
	-1.88 <sup>(a)</sup>	-1.84 <sup>(a)<sup>-</sup></sup>	1 70 <sup>(b)</sup>	$206^{(b)}$					
$Z_{pH acid}$	[-2.22;-	[-2.18;-	$-1.79^{\circ}$	$-2.00^{\circ}$					
-	1.53]	1.50]	[-2.13,-1.44]	[-2.47,-1.03]					
7			3.34 <sup>(b)</sup>	3.81 <sup>(b)</sup>					
∠ <sub>pH basic</sub>			[2.15;4.53]	[2.13;5.49]					
$\mathbf{Z} = (\mathbf{m} \mathbf{M})$	$18.04^{(c)}$	34.03 <sup>(c)</sup>	101.63 <sup>(d)</sup>	62.63 <sup>(d)</sup>					
$Z_{AH}$ (IIIIVI)	[7.90;28.17]	[7.77;60.28]	[65.03;138.23]	[44.82;80.44]					
	$2.84^{(e)}$	$2.98^{(e)}$							
$Log_{10}(O[NaCl] opt)$ - $\Delta$	[2.63;3.05]	[2.77;3.19]	(2)	(2)					
٨			$0.27^{(1)}$	$0.33^{(f)}$					
$\Delta$			[0.11;0.43]	[0.18;0.48]					
$Z_{\rm M} \approx (0/((\omega t/\omega t)))$			$6.30^{(1)}$	$5.49^{(1)}$					
$\Sigma_{NaCl}$ (70 (Wi/Wi))			[0.81;11.78]	[1.82;9.16]					
$Z_{\pi}(^{\circ}C)$		2	25.04						
$\mathbf{Z}_{T}(\mathbf{C})$		[21.6	57;28.42]						
$T \rightarrow (^{\circ}C)$			8.75						
Topt (C)		[4.7	1;12.80]						
$T(^{\circ}C)$		2	23.56						
	[19.90;27.22]								
Number of kinetics			138						
Root mean square error		0	0.204						

Table 6 Estimates of parameters of the global model and confidence intervals in the square brackets ( $\alpha$ =0.05) for <u>Listeria monocytogenes</u>.

(a) is linked to the (i) experimental plan for pH; (b) is linked to the (ii) experimental plan for pH; (c) is linked to the (i) experimental plan for lactic acid concentration; (d) is linked to the (ii) experimental plan for acid lactic concentration; (e) is linked to the (i) experimental plan for sodium chloride concentration; (f) is linked to the (ii) experimental plan for sodium chloride concentration.

Characteristic values of $Log_{10}(\delta)$	$\delta_{I}$	(h)	$\delta_2$	(h)					
	3	.07	3.	17					
LO <b>g</b> <sub>10</sub> ( <i>OpH</i> *, 0 [AH], 0.5% [NaCl],T*)	[2.97	7;3.17]	[3.08;3.26]						
$I_{0}$	3	.64	3.	3.39					
$LOG_{10}(O_{pH}=5.2, 0 [AH], 0.5\% [NaC1], 1^*)$	[3.29	9;4.00]	[3.03;3.74]						
$L_{0}\sigma_{10}(\delta_{1}, \mu, \tau_{0}, \sigma_{1}, \mu) = \sigma_{0}(\tau_{1}, \tau_{1}, \sigma_{1}, \sigma_{1}, \mu)$	3	.83	3.70						
Log10(0pH=/.0, 0 [AH], 0.5% [NaCI], 1*)	[3.19	9;4.47]	[2.60]	;4.80]					
Parameters characterising	Simpl	e stress	Double	e stress					
bacterial sensitivity	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)					
nH		5.90							
priopt	(-)	[5.66;6.	.13]	(1-)					
ZnH acid	$-2.23^{(a)}$	$-2.35^{(a)}$	$-1.92^{(6)}$	-1.93(6)					
<b>2</b> рн асіа	[-2.43;-2.04]	[-2.55;-2.14]	[-2.10;-1.74]	[-2.11;-1.75]					
7			1.78 <sup>(b)</sup>	2.41 <sup>(b)</sup>					
2 pH basic			[1.49;2.07]	[1.78;3.03]					
Z(mM)	60.47 <sup>(c)</sup>	197.39 <sup>(c)</sup>	$17.78^{(d)}$	$21.14^{(d)}$					
$\mathbf{Z}_{AH}$ (IIIIVI)	[16.46;104.47]	[-62.15;456.92]	[12.91;22.64]	[15.03;27.25]					
٨	$2.21^{(e)}$	$1.09^{(e)}$	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	$0.92^{(1)}$					
$\Delta$	[1.59;2.83]	[0.02;2.16]		[0.79;1.06]					
$Z_{\rm ex} \approx (0/2 ({\rm hut/hut}))$	9.02 <sup>(e)</sup>	9.99 <sup>(e)</sup>	5.83 <sup>(f)</sup>	8.95 <sup>(1)</sup>					
$\Sigma_{NaCl}$ (70 (WI/WI))	[6.81;11.24]	[3.08;16.90]	[4.91;6.76]	[6.82;11.08]					
$\overline{Z_{\pi}}(^{\circ}C)$		24.3	1						
$Z_T(C)$		[21.44;2]	7.18]						
$T (^{\circ}C)$		10.4	1						
T <sub>opt</sub> (C)		[7.03;13	.79]						
$T(^{\circ}C)$	21.75								
$I_c(C)$	[18.69;24.81]								
Number of kinetics		136							
Root mean square error		0.174	4						

Table 7 Estimates of parameters of the global model and confidence intervals in the square brackets ( $\alpha$ =0.05) for <u>Salmonella typhimurium</u>.

(a) is linked to the (i) experimental plan for pH; (b) is linked to the (ii) experimental plan for pH; (c) is linked to the (i) experimental plan for acid lactic concentration; (d) is linked to the (ii) experimental plan for acid lactic concentration; (e) is linked to the (i) experimental plan for sodium chloride concentration; (f) is linked to the (ii) experimental plan for sodium chloride concentration.

When two stress or more were combined, the specific bacterial sensitivity for these stresses varied. The sensitivity parameters ( $Z_{pH}$ ,  $Z_{AH}$ ,  $Z_{NaCl}$ ,  $\Delta$ ) reflected this change by a decreased value in the case of two combined stress. The global model (10) which neglects interactions between factors could then not be fit on our data without using a" biological destruction value" including interactions effects. It led us to use different sensitivity parameters values according to the level of interaction. The junction between the different "one factor at a time" plans led us to reduce at only 3 characteristics values of  $\delta$  for each subpopulation and each bacterial species instead of 2  $\delta_{pH \ opt}$  for pH model , 2  $\delta_{max}$  for acid model, 2  $\delta_{[NaCl]opt}$  for sodium chloride model and 3  $\delta$ " for temperature model. These characteristics values of  $\delta$  were :

- (i)  $\delta_1^*$  and  $\delta_2^*$  at reference conditions: pH\*=4.0, at 0 M of undissociated lactic acid, at NaCl<sub>opt</sub> sodium chloride concentration (0.5 %) and at 12°C. These values were inputs for the pH stress without interaction, and for the lactic acid and the osmotic stress with interaction. The chosen physicochemical conditions were the intersection point of the (i) experimental plan for pH, and the (ii) experimental plans for lactic acid and sodium chloride concentrations (see experimental design part).
- (ii)  $\delta_1$  and  $\delta_2$  at pH=5.2, at 0 M of undissociated lactic acid, at NaCl<sub>opt</sub> sodium chloride concentration (0.5 %) and at the reference temperature T<sup>\*</sup>=12°C. These values were inputs for the lactic acid stress without interaction ((i) experimental plan for lactic acid, see experimental design part).
- (iii)  $\delta_1$  and  $\delta_2$  at the reference pH=7.0, at 0 M of undissociated lactic acid, at NaCl<sub>opt</sub> sodium chloride concentration (0.5 %) and at the reference temperature T<sup>\*</sup>=12°C. These values were used for the osmotic stress without interaction. ((i) experimental plan for sodium chloride plan, see experimental design part)

The estimated values of the parameters are presented in tables 6 and 7. The representation of predicted  $\delta$  versus observed  $\delta$  showed the goodness of fit of the model as well for  $\delta_1$  as for  $\delta_2$  (figure 9). The interactions between factors were roughly taken into account in this global model by adapting sensitivity parameters estimates on conditions. However, the structure of the model allows the addition of a new partial biological destruction values as  $\lambda_{\text{interactions}}$ .

The utilization of the double Weibull model and the secondary modelling developed in this work might be useful for a lot of process where biphasic inactivation is observed, like mild thermal treatment (41), pulsed fields inactivation (87), high hydrostatic pressure inactivation (45), or antimicrobial compounds (22). But before, it would need more investigations on the quantification of the interactions between the inactivation factors and an extrapolation to food environment.

#### Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Agriculture via the "Aliment Qualité Sécurité" program, in association with the national program in predictive microbiology Sym'previus. The PhD fellowship of Louis Coroller was granted by the UNIR (Ultra-propre, Nutrition, Industrie, Recherche) association and the National Association of Technical Research.

# References

- 1. Abee, T., and J. A. Wouters. 1999. Microbial stress response in minimal processing. International Journal of Food Microbiology 50:65-91.
- 2. Ahamad, N., and E. H. Marth. 1989. Behaviour of Listeria monocytogenes at 7, 13, 21 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. Journal of Food Protection 52:688-695.
- 3. Akaike, H. (1973). Information theory and extension of the maximum likelihood principle, p. 267-281. *In* B.N. Petrov and and F. Cza'ki, (ed.). Proceedings of the 2nd International Symposium of Information Theory, Akademiai Kiado, Budapest.
- 4. Albert, I., and P. Mafart. 2005. A modified Weibull model for bacterial inactivation. International Journal of Food Microbiology 100:197-211.
- 5. Angelidis, A. S., L. T. Smith, L. M. Hoffman, and G. M. Smith. 2002. Identification of OpuC as a Chill-Activated and Osmotically Activated Carnitine Transporter in Listeria monocytogenes. Applied Environmental Microbiology 68:2644-2650.
- 6. Annous, B. A., L. A. Becker, D. O. Bayles, D. P. Labeda, and B. J. Wilkinson. 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of Listeria monocytogenes at low temperatures. Applied Environmental Microbiology 63:3887-3894.
- 7. Baranyi, J., T. Ross, T. A. McMeekin, and T. A. Roberts. 1996. Effects of parameterization on the performance of empirical models used in "predictive microbiology". Food Microbiology 13:83-91.
- 8. Barker, C., and S. F. Park. 2001. Sensitization of Listeria monocytogenes to Low pH, Organic Acids, and Osmotic Stress by Ethanol. Applied Environmental Microbiology 67:1594-1600.
- 9. Beales, N. 2004. Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 3:1-20.
- 10. Bearson, S., B. Bearson, and J. W. Foster. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiology Letters 147:173-180.
- Becker, L. A., S. N. Evans, R. W. Hutkins, and A. K. Benson. 2000. Role of sigma B in Adaptation of Listeria monocytogenes to Growth at Low Temperature. Journal of Bacteriology 182:7083-7087.
- 12. Beuchat, L. R., and A. J. Scouten. 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on alfalfa seeds. Journal of Applied Microbiology 92:382-95.
- Bjornsdottir, K., F. Breidt, Jr., and R. F. McFeeters. 2006. Protective Effects of Organic Acids on Survival of Escherichia coli O157:H7 in Acidic Environments. Applied Environmental Microbiology 72:660-664.
- 14. Booth, I. R. 1999. The regulation of intracellular pH in bacteria. Novartis Foundation Symposium 221:19-28.
- 15. Breand, S. 1998. Etude biométrique de la réponse d'une population bactérienne à une variation défavorable de température ou de pH. Université Claude Bernard, Lyon, France.
- 16. Brondsted, L., B. H. Kallipolitis, H. Ingmer, and S. Knochel. 2003. kdpE and a putative RsbQ homologue contribute to growth of Listeria monocytogenes at high osmolarity and low temperature. FEMS Microbiology Letters 219:233-239.
- Buchanan, R. L., M. A. Golden, R. C. Whiting, J. G. Phillips, and J. L. Smith. 1994. Non-thermal inactivation models for Listeria monocytogenes. Journal of Food Science 59:179-188.

- 18. Buchanan, R. L., and M. H. Golden. 1994. Interaction of citric acid concentration and pH on the kinetics of Listeria monocytogenes inactivation. Journal of Food Protection 57:567-570.
- 19. Buchanan, R. L., and M. H. Golden. 1998. Interactions Between pH and Malic Acid Concentration on the Inactivation of Listeria monocytogenes. Journal of Food Safety 18:37-48.
- 20. Buchanan, R. L., M. H. Golden, and J. G. Phillips. 1997. Expanded models for the non-thermal inactivation of Listeria monocytogenes. Journal of Applied Microbiology 82:567-577.
- 21. Buchanan, R. L., M. H. Golden, and R. C. Whiting. 1993. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of Listeria monocytogenes inactivation. Journal of Food Protection 56:474-478.
- 22. Buncic, S., C. M. Fitzgerald, R. G. Bell, and J. A. Hudson. 1995. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature. Journal of Food Safety 15:247-264.
- 23. Carty, S. M., K. R. Sreekumar, and C. R. H. Raetz. 1999. Effect of Cold Shock on Lipid A Biosynthesis in Escherichia coli. induction at 12 °C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. J. Biol. Chem. 274:9677-9685.
- 24. Cerf, O. 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores, a review. Journal of Applied Bacteriology 42:1-19.
- 25. Conner, D., V. Scott, and D. Bernard. 1990. Growth, inhibition and survival of Listeria monocytogenes as affected by acidic conditions. Journal of Food Protection 53:652-655.
- 26. Coroller, L., I. Leguerinel, E. Mettler, N. Savy, and P. Mafart. 2006. A general model for fitting various shapes of microbial inactivation curves. Applied Environmental Microbiology submitted.
- 27. Cotter, P. D., and C. Hill. 2003. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67:429-453.
- 28. Couvert, O., S. Gaillard, N. Savy, P. Mafart, and I. Leguerinel. 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. International Journal of Food Microbiology 101:73-81.
- 29. Couvert, O., I. Leguerinel, and P. Mafart. 1999. Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of Bacillus cereus spores. International Journal of Food Microbiology 49:57-62.
- 30. Dilworth, M. J., and A. R. Glenn. 1999. Problems of adverse pH and bacterial strategies to combat it. Novartis Foundation Symposium 221:4-14.
- 31. Duche, O., F. Tremoulet, P. Glaser, and J. Labadie. 2002. Salt Stress Proteins Induced in Listeria monocytogenes. Applied Environmental Microbiology 68:1491-1498.
- 32. Dykes, G. A., and S. M. Moorhead. 2000. Survival of osmotic and acid stress by Listeria monocytogenes strains of clinical or meat origin. International Journal of Food Microbiology 56:161-166.
- 33. Erkmen, O. 2000. Inactivation kinetics of Listeria monocytogenes in turkish white cheese during the ripening period. Journal of Food Engineering 46:127-131.
- 34. Fernandez, A., J. Collado, L. M. Cunha, M. J. Ocio, and A. Martinez. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of Bacillus cereus in vegetable substrate. International Journal of Food Microbiology 77:147-153.
- 35. Foster, J. W. 1993. The acid tolerance response of Salmonella typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. Journal of Applied Bacteriology 175:1981-1987.

- 36. Foster, J. W. 1999. When protons attack: Microbial strategies of acid adaptation. Current Opinion in Microbiology 2:170-174.
- 37. Foster, J. W., and H. K. Hall. 1990. Adaptive acidification tolerance response of Salmonella typhimurium. Journal of Bacteriology 172:771-778.
- 38. Foster, J. W., and H. K. Hall. 1991. Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of Salmonella typhimurium. Journal of Bacteriology 173:5129-5135.
- 39. Gaillard, S., I. Leguerinel, and P. Mafart. 1998. Model for Combined Effects of Temperature, pH and Water Activity on Thermal Inactivation of Bacillus cereus Spores. Journal of Food Science 63:887-889.
- 40. Gawande, P. V., and A. A. Bhagwat. 2002. Protective effects of cold temperature and surface-contact on acid tolerance of Salmonella spp. Journal of Applied Microbiology 93:689-696.
- 41. Geeraerd, A. H., C. H. Herremans, and J. F. V. Impe. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. International Journal of Food Microbiology 59:185-209.
- 42. Geeraerd, A. H., V. P. Valdramidis, F. Devlieghere, H. Bernaert, J. Debevere, and J. F. Van Impe. 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. International Journal of Food Microbiology 91:229-244.
- 43. Gerhardt, P. N. M., L. Tombras Smith, and G. M. Smith. 2000. Osmotic and Chill Activation of Glycine Betaine Porter II in Listeria monocytogenes Membrane Vesicles. Journal of Bacteriology 182:2544-2550.
- Greenacre, E. J., T. F. Brocklehurst, C. R. Waspe, D. R. Wilson, and P. D. G. Wilson. 2003. Salmonella enterica Serovar Typhimurium and Listeria monocytogenes Acid Tolerance Response Induced by Organic Acids at 20°C: Optimization and Modeling. Appl. Environ. Microbiol. 69:3945-3951.
- 45. Guan, D., H. Chen, and D. G. Hoover. 2005. Inactivation of Salmonella typhimurium DT 104 in UHT whole milk by high hydrostatic pressure. International Journal of Food Microbiology 104:145-153.
- 46. Hajmeer, M., I. Basheer, C. Hew, and D. O. Cliver. 2006. Modeling the survival of Salmonella spp. in chorizos. International Journal of Food Microbiology 107:59-67.
- 47. Hall, H. K., K. L. Karem, and J. W. Foster. 1995. Molecular responses of microbes to environmental pH stress. Advances in Microbial Physiology 37:229-272.
- 48. Hickey, E. W., and I. N. Hirshfield. 1990. Low-pH-induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Applied Environmental Microbiology 56:1038-1045.
- 49. Hill, C., P. D. Cotter, R. D. Sleator, and C. G. M. Gahan. 2002. Bacterial stress response in Listeria monocytogenes: jumping the hurdles imposed by minimal processing. International Dairy Journal 12:273-283.
- 50. Holliday, S. L., and L. R. Beuchat. 2003. Viability of Salmonella, Escherichia coli O157:H7 and Listeria monocytogenes in yellow fat spreads as affected by storage temperature. Journal of Food Protection 66:549-558.
- 51. Hurme, R., and M. Rhen. 1998. Temperature sensing in bacterial gene regulation what it all boils down to. Molecular Microbiology 30:1-6.
- 52. Hwang, C.-A., and M. L. Tamplin. 2005. The influence of mayonnaise pH and storage temperature on the growth of Listeria monocytogenes in seafood salad. International Journal of Food Microbiology 102:277-285.
- 53. Ita, P., and R. Hutkins. 1991. Intracellular pH and survival of Listeria monocytogenes Scott A in tryptic soy broth containing acid, lactic and hydrochloric acids. Journal of Food Protection 54:15-19.

- 54. Ko, R., L. T. Smith, and G. M. Smith. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on Listeria monocytogenes. Journal of Bacteriology 176:426-431.
- 55. Koutsoumanis, K., and J. N. Sofos. 2004. Comparative acid stress response of Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7 and Salmonella Typhimurium after habituation at different pH conditions. Letters in Applied Microbiology 38:321-326.
- 56. Lee, I. S., J. L. Slonczewski, and J. W. Foster. 1994. A low-pH-inducible, stationaryphase acid tolerance response in Salmonella typhimurium. Journal of Bacteriology 176:1422-1426.
- 57. Lekkas, C., A. Kakouri, E. Paleologos, L. P. Voutsinas, M. G. Kontominas, and J. Samelis. 2006. Survival of Escherichia coli O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 °C. Food Microbiology 23:268-276.
- 58. Liu, S., J. E. Graham, L. Bigelow, P. D. Morse, II, and B. J. Wilkinson. 2002. Identification of Listeria monocytogenes Genes Expressed in Response to Growth at Low Temperature. Applied Environmental Microbiology 68:1697-1705.
- 59. Mafart, P. 2000. Taking injuries of surviving bacteria into account for optimising heat treatments. International Journal of Food Microbiology 55:175-179.
- 60. Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, and I. Leguerinel. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of Weilbull frequency distribution model. International Journal of Food Microbiology 72:107-113.
- 61. Mafart, P., and I. Leguérinel. 1998. Modelling combined effect of temperature and pH on the heat resistance of spores by a non-linear Bigelow equation. Journal of Food Science 63:6-8.
- 62. McKellar, R. C., and X. Lu. 2003. Modeling Microbial Responses in Food. CRC press, Boca Raton (USA).
- 63. McQuarrie, A. D., and C.-L. Tsai. 1998. Regression and Time Series Model Selection, River Edge.
- 64. Membre, J. M., V. Majchrzac, and I. Jolly. 1997. Effects of temperature, pH, glucose and citric acid on the inactivation of Samonella typhimurium in reduced calorie mayonnaise. Journal of Food Protection 60:1497-1501.
- 65. Membre, J. M., J. Thurette, and M. Catteau. 1997. Modelling the growth, survival and death of Listeria monocytogenes. Journal of Applied Microbiology 82:345-350.
- 66. Miller, A. J. 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of Listeria monocytogenes Scott A. Journal of Food Protection 55:414-418.
- 67. O'Byrne, C. P., and I. R. Booth. 2002. Osmoregulation and its importance to foodborne microorganisms. International Journal of Food Microbiology 74:203-216.
- 68. O'Driscoll, B., C. G. M. Gahan, and C. Hill. 1997. Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis Analysis of the Acid Tolerance Response in Listeria monocytogenes LO28. Applied Environmental Microbiology 63:2679-2685.
- 69. Peleg, M., and C. M. Penchina. 2000. Modelling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40:159-172.
- 70. Ramos, J. L., M.-T. Gallegos, S. Marques, M.-I. Ramos-Gonzalez, M. Espinosa-Urgel, and A. Segura. 2001. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. Current Opinion in Microbiology 4:166-171.
- 71. Richard, H., and J. W. Foster. 2004. Escherichia coli glutamate- and argininedependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. Journal of Bacteriology 186:6032-6041.
- 72. Russell, N. J. 1984. Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. Trends in Biochemical Sciences 9:108-112.

- 73. Samelis, J., J. N. Sofos, P. A. Kendall, and G. C. Smith. 2001. Influence of the Natural Microbial Flora on the Acid Tolerance Response of Listeria monocytogenes in a Model System of Fresh Meat Decontamination Fluids. Applied Environmental Microbiology 67:2410-2420.
- 74. Shabala, L., B. Budde, T. Ross, H. Siegumfeldt, and T. McMeekin. 2002. Responses of Listeria monocytogenes to acid stress and glucose availability monitored by measurements of intracellular pH and viable counts. International Journal of Food Microbiology 75:89-97.
- 75. Shahamat, M., A. Seaman, and M. Woodbine. 1980. Survival of Listeria monocytogenens in high salt concentration. Zentralblatt Fur Bakteriologie Hygienie A 246:506-511.
- 76. Skandamis, P. N., and G.-J. E. Nychas. 2000. Development and Evaluation of a Model Predicting the Survival of Escherichia coli O157:H7 NCTC 12900 in Homemade Eggplant Salad at Various Temperatures, pHs, and Oregano Essential Oil Concentrations. Applied Environmental Microbiology 66:1646-1653.
- 77. Sorrells, K., and D. Enigl. 1989. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth of Listeria monocytogenes. Journal of Food Safety 11:31-37.
- 78. Sperber, W. 1983. Influence of water activity on food borne bacteria. Journal of Food Protection 46:142-150.
- 79. Tetteh, G. L., and L. R. Beuchat. 2003. Survival, growth, and inactivation of acidstressed Shigella flexneri as affected by pH and temperature. International Journal of Food Microbiology 87:131-138.
- 80. Thieringer, H. A., P. G. Jones, and M. Inouye. 1998. Cold shock and adaptation. BioEssays 20:49-57.
- 81. van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International Journal of Food Microbiology 74:139-59.
- 82. Virto, R., D. Sanz, I. Alvarez, Condon, and J. Raso. 2005. Inactivation kinetics of Yersinia enterocolitica by citric and lactic acid at different temperatures. International Journal of Food Microbiology 103:251-257.
- 83. Whiting, R. C. 1993. Modeling bacterial survival in unfavorable environments. Journal of Industrial Microbiology 12:240-246.
- 84. Whiting, R. C., S. Sackitey, S. Calderone, K. Morely, and J. G. Phillips. 1996. Model for the Survival of Staphylococcus aureus in Nongrowth Environments. International Journal of Food Microbiology 31:231-243.
- 85. Wood, J. M., E. Bremer, L. N. Csonka, R. Kraemer, B. Poolman, T. van der Heide, and L. T. Smith. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 130:437.
- 86. Wouters, P. C., N. Dutreux, J. P. P. M. Smelt, and H. L. M. Lelieveld. 1999. Effects of Pulsed Electric Fields on Inactivation Kinetics of Listeria innocua. Applied Environmental Microbiology 65:5364-5371.
- 87. Xiong, R., G. Xie, A. E. Edmondson, and M. A. Sheard. 1999. A mathematical model for bacterial inactivation. International Journal of Food Microbiology 46:45-55.
- 88. Zwietering, M. H., T. Wijtzes, J. C. De Wit, and K. van't Riet. 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. Journal of Food Protection 55:973-979

# **Chapitre 4 : Modélisation Tertiaire**

## 1. Validation de la modélisation au sein d'aliments

Pour décrire l'inactivation de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*, nous disposons d'un modèle primaire reposant sur une double distribution de Weibull de la résistance bactérienne au stress et d'une modélisation secondaire, de type modulaire, permettant de caractériser la résistance bactérienne en fonction du pH, de la concentration en acide lactique non dissocié, de la concentration en chlorure de sodium, et de la température d'incubation. Avant de pouvoir effectuer des prévisions de l'impact d'une modification de ces facteurs en matrice alimentaire, il est nécessaire de vérifier si les valeurs des paramètres de sensibilité des espèces étudiées sont bien conservées entre un milieu synthétique comme le BHI et différentes matrices alimentaires.

Pour valider cette hypothèse nous avons choisi deux aliments (un fromage frais de chèvre et une vinaigrette allégée) et une saumure. Le point commun entre ces produits est la stabilité physicochimique dans le temps. Il est en effet nécessaire que ces propriétés de la matrice soient stables, pour pouvoir appliquer l'approche développée. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, la modélisation secondaire permet de dissocier l'effet de chaque facteur considéré par des modules appelés « valeurs de destruction biologique » par rapport au facteur étudié. Le paramètre  $\delta^*$  permet alors de caractériser la résistance bactérienne spécifique à l'environnement bactérien considéré, à pH 4,0, pour une absence d'acide lactique, pour 0,5 % de sel et 12°C d'incubation. Ce paramètre  $\delta^*$  est une constante qui englobe l'influence de tous les facteurs agissant sur la résistance bactérienne, mais qui ne sont pas pris en compte par leur intégration dans un module, comme la texture, le potentiel redox, ou l'antagonisme provoqué par la présence d'autres microorganismes, mais aussi la présence de composé chimique protecteur ou inhibiteur. Si les facteurs intrinsèques à l'environnement ne sont pas constants, l'utilisation d'une constante  $\delta^*$  est inadéquate.

Trois valeurs de  $\delta^*$ , correspondant respectivement à chaque milieu, sont estimées à partir de cinétiques en fromage, vinaigrette et saumure à 12°C. A partir de ces valeurs et des paramètres de sensibilité estimés en milieu synthétique, une simulation de l'inactivation bactérienne peut être faite pour ces produits à un nouveau pH, une nouvelle concentration en acide lactique, une autre concentration en chlorure de sodium, ou une autre température de stockage. En parallèle, les aliments sont modifiés afin d'acquérir des cinétiques de l'évolution de l'effectif bactérien aux nouvelles conditions. Afin de valider l'hypothèse de la conservation des sensibilités bactérienne entre deux environnements, la prédiction de l'inactivation bactérienne et la survie bactérienne observée dans l'aliment modifié sont comparées. Ces comparaisons sont effectuées à deux niveaux :

- au niveau secondaire, en comparant les paramètres de résistance  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  observés et prédits.
- au niveau primaire, en comparant les courbes de survie observées et prédites.

La sensibilité des bactéries vis-à-vis d'une acidification (pH et concentration en acide faible non dissocié), et de la température est effectivement bien conservée en fromage frais et vinaigrette. Par contre, l'addition de 15% de sel dans le fromage frais augmente la survie des microorganismes contrairement aux observations faites en bouillon cœur cervelle (BHI). Et en saumure, contenant 35% de chlorure de sodium, la sensibilité des microorganismes vis-à-vis d'une acidification est moindre par rapport à la sensibilité observée en milieu synthétique. Le sel a sous certaines conditions physicochimiques un effet protecteur pour la survie.

# 2. Validation of a modular approach for the non-thermal inactivation modelling of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in food products

Article soumis, AEM01626-06 Applied and Environmental Microbiology

#### Abstract

In a previous work, the double Weibull model was proposed to describe non-thermal inactivation of Listeria monocytogenes and of Salmonella typhimurium. This model led to a secondary modelling of the bacterial resistance including the effects of pH, concentration of the lactic acid protonated form, sodium chloride concentration and temperature of incubation in brain heart infusion broth. The modelling way was close to the gamma concept and to the cardinal parameters modelling. It used specific functions for each factor which modulated the bacterial resistance, and a parameter which was characteristic of the bacterial resistance in standard conditions of the used media. In order to validate the assumption of bacterial sensitivity conservation between synthetic media (BHI) and food products, challenge tests were made with cheese brine, fresh and mild goat's cheese and low calorie salad dressing, contaminated with Listeria monocytogenes or Salmonella typhimurium. These kinetics allowed the estimation of characteristic bacterial resistance in each food. In a second time, kinetics were acquired in the food production to which acid, sodium chloride were added or for which the temperature of storage was increased and decreased. The comparisons of these kinetics in modified food product to prediction of bacterial inactivation validated the assumption of the conservation of bacterial sensitivity to acid stress and temperature. The amount of sodium chloride or high concentration of salt had a protective effect on the bacterial resistance, and that was not previously observed in BHI, leading to the reject of the sodium chloride function.

## 2.1. Introduction

In the area of Predictive Microbiology, the modelling generally includes three steps (31). The primary modelling describes the evolution of a bacterial population during time. The secondary modelling describes the effect of environmental factors (for example the pH of the food) or of other explicative factors regarding the bacterial cells (for example their physiological state) on the primary parameters. The third step is then the combination of the secondary and primary models in software which allows, for example, anticipating the evolution of a bacterial population in relation with environmental factors.

The double Weibull distribution model allows the description of bacterial inactivation during time of exposure to stress (10). A particularity of this model is to be able to describe all the typical shapes of survival curves: convex, concave, log-linear, but also sigmoïdal and more complex shapes like biphasic with latency to mortality (8, 15, 29). The second particularity is its parsimony. Only three parameters varies with the physiological states of bacterial population or/and to the intensity of stress (9, 10).

This model has led to a secondary modelling of the bacterial resistance as a function of the intensity of pH stress, lactic acid stress, sodium chloride stress which were modulated by

temperature (9). The secondary modelling approach was close to the "gamma concept" and to the Cardinal parameters models (2, 3, 20, 25, 26, 32). According to these approaches, the inhibitory effects of environmental factors were assumed to be multiplicative and independent of the medium, so that a single parameter is characteristic of bacterial growth in a given medium (23). This last parameter is the growth rate or the bacterial resistance at optimal environmental conditions or given conditions for growth or survival respectively. It reflects the influence of intrinsic factors of the food product. These intrinsic factors can be the texture of food, concentration of antimicrobial compounds, interaction with other microorganisms, and all "minor" factors which are not included in the modelling. When such models are implemented, it is implicitly assumed that included factors keep constant during growth or inactivation.

According to this approach, the bacterial sensitivity parameters are estimated in a synthetic medium, and challenge tests in food product are used to calibrate the characteristic food parameter. The aim of this work was to validate the overall modelling system (primary and secondary) in order to predict the inactivation in food product, but, at first, it implies to validate the assumption of conservative bacterial sensitivity between different environments.

# 2.2. Materials and methods

# 2.2.1. Microorganism and inoculum preparation

The studied bacterial strains were *Salmonella enterica serovar typhimurium* isolated from brine (strain ADQP305 provided by ADRIA) and *Listeria monocytogenes* isolated from meat product (strain SOR100 provided by SOREDAB). The strains were stored at -80°C in medium composed by BHI (BIOKAR DIAGNOSTICS) broth supplemented with 50% (v/v) glycerol. The primary incubation of the vegetative cells was made in 100 ml of BHI broth in 250 ml flask at 37°C and shaken at 100 rotations per minute. After 8 hours of incubation, 1 ml of this culture was transferred into a second flask of 100 ml BHI broth. After 16 hours of incubation at 37°C, the bacterial population is in stationary phase since about 10 hours and the bacterial resistance of vegetative cells is high {Coroller, 2006 #418} The bacterial concentration is about  $4.10^9$  CFU.ml<sup>-1</sup> for *Salmonella typhimurium* and  $10^9$  CFU.ml<sup>-1</sup> for *Listeria monocytogenes*. A sample of this culture was taken off and diluted in BHI broth, in order to contaminate food products.

## 2.2.2. Food product challenge testing and enumeration of viable cells

Three commercial food products (fresh and mild goat's cheese, low calorie salad dressing and cheese brine) were chosen for theirs properties of physicochemical stability throughout time, for growth inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* and for lactic acid as major acid. Cheese brine, fresh and mild goat's cheese and salad dressing low calorie were contaminated at a concentration close to 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> and 10<sup>7</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> respectively. The fresh and mild goat's cheese was divided into 15 g samples. 250 ml of salad dressing low calorie were incubated in original bottle which was shacked before each enumeration. 100 ml of cheese brine were incubated in 250 ml flask and shaken at 100 rotations per minute. Two repetitions of each experiment were made with at least 10 enumerations of survivors.

Survivors were enumerated immediately after inoculation and at appropriate time intervals by surface-plating cultures on BHI agar (BIOKAR DIAGNOSTICS) using a Spiral Plater

(WASP1, Don Whitley, Shipley, West Yorkshire, UK). Dilutions were made in tryptone salt broth. The enumeration was made after variable incubation times (24 to 72 hrs) at 37°C regarding the conditions of inactivation.

According to the food products, different challenge tests were made (table 1):

- (i) non-modified food products at a temperature of incubation equal to 12°C, temperature previously used for the modelling of pH, lactic acid and sodium chloride influences in BHI.
- (ii) non-modified food products at a temperature of incubation equal to 4°C or to 25°C.
- (iii) pH modified food products by an addition of hydrochloric acid, sodium hydroxide or lactic acid (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland)
- (iv) Salt modified food products by an addition of sodium chloride (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Deventer, Holland).

Table 1 Physicochemical properties of food products and storage temperature for challenge tests. (a) contamination with <u>Listeria monocytogenes</u>, (b) contamination with <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u>.(\* sodium hydroxide addition)

Food products	trial	рН	Concentration of sodium chloride % (wt/wt)	Lactic acid concentration (g/100g)	Temperature of storage (°C)
	calibration	$4.44^{(a,b)}$	1.2	2.12	12
	HCl addition	4.03 <sup>(a)</sup> 3.87 <sup>(b)</sup>	1.2	2.12	12
fresh and mild goat's cheese	Lactic acid addition	$4.07^{(a)}$ $4.08^{(b)}$	1.2	2.32 <sup>(a)</sup> 2.30 <sup>(b)</sup>	12
e	Salt addition	$4.44^{(a,b)}$	15.2	2.12	12
	Warm	$4.44^{(a,b)}$	1.2	2.12	25
	Cold	$4.44^{(a,b)}$	1.2	2.12	4
	calibration	$3.87^{(a,b)}$	0.0	2.55	12
	HCl addition	4.23 <sup>(a)*</sup> 3.34 <sup>(b)</sup>	0.0	2.55	12
salad dressing low calorie	Lactic acid addition	3.64 <sup>(b)</sup>	0.0	2.77 <sup>(b)</sup>	12
	Warm	3.87 <sup>(a,b)</sup>	0.0	2.55	25
	Cold	3.87 <sup>(a,b)</sup>	0.0	2.55	4
	calibration	$4.82^{(a,b)}$	35.0	5.62	12
	HCl addition	4.28 <sup>(a,b)</sup>	35.0	5.62	12
cheese brine	Lactic acid addition	4.37 <sup>(a,b)</sup>	35.0	5.86	12
	Warm	4.82 <sup>(a,b)</sup>	35.0	5.62	25

#### 2.2.3. Primary and secondary model

The double Weibull model was used as primary model (10). This model is based on the assumption of the coexistence of two subpopulations with different resistances to stress, which follow a Weibull distribution (22, 30). It can be written as follows:

$$N(t) = \frac{N_0}{1+10^{\alpha}} \left[ 10^{-\left(\frac{t}{\delta_1}\right)^p + \alpha} + 10^{-\left(\frac{t}{\delta_2}\right)^p} \right]$$
(1)

Where N is the number of survivors at t time,  $N_0$  is the inoculum size, p a shape parameter and  $\delta$  the treatment time for the first decimal reduction. Indices 1 and 2 are linked to the two different subpopulations. Subpopulation 1 is assumed to be more sensitive to stress than subpopulation 2 ( $\delta_1 < \delta_2$ ). The parameter  $\alpha$  is the logit transformation of the fraction of the subpopulation 1 in the population. This model was fitted on a logarithm decimal transformation to respect the assumption of homogeneous variance.

The secondary model, describing the influences of environmental factors on the inactivation rates, was based on modular approach and was written as follows (9):

$$\log_{10}(\delta) = \log_{10}(\delta^*) - \sum \log_{10}(\lambda_i) \qquad (2)$$

Where  $\lambda_i$  is the so called partial biological destruction value related to each explicative factors (i),  $\delta^*$  is the first reduction time observed at reference environmental conditions. For pH, undissociated lactic concentration, sodium chloride concentration and temperature, the  $\delta^*$  value is the first reduction time observed at the reference conditions of treatment (pH<sup>\*</sup>=4.0, [AH]=0 mM, [NaCl]=0.5 %, T<sup>\*</sup>=12°C). This model was applied to  $\delta_1$  and  $\delta_2$ .

The biological destruction values related to pH was defined as follows:

$$\log_{10}(\lambda_{pH}) = \begin{cases} \left(\frac{pH - pH_{opt}}{z_{pH_{acide}}}\right)^{3} - \left(\frac{pH^{*} - pH_{opt}}{z_{pH_{acide}}}\right)^{3} & pH \le pH_{opt} \\ \left(\frac{pH - pH_{opt}}{z_{pH_{basique}}}\right)^{3} - \left(\frac{pH^{*} - pH_{opt}}{z_{pH_{acide}}}\right)^{3} & pH > pH_{opt} \end{cases}$$
(3)

Where  $Z_{pH}$  is the difference of pH from optimal pH ( $pH_{opt}$ ) for survival, which leads to a tenfold reduction of  $\delta$  value observed at  $pH_{opt}$ . If the pH stress is acid, with respect to  $pH_{opt}$ ,  $Z_{pH}$  values is called "acid" and for the other case "basic".

The biological destruction values related to concentration of protonated form of lactic acid was defined as follows:

$$\log_{10}\left(\lambda_{[AH]}\right) = \left(\frac{[AH]}{z_{AH}}\right)^{\frac{1}{2}}$$
(4)

Where [AH] is the undissociated lactic acid concentration;  $Z_{AH}$  is the addition of undissociated lactic acid concentration, which leads to a tenfold reduction of  $\delta$  value observed at an undissociated lactic acid concentration of 0 M.

The biological destruction values related to concentration of sodium chloride concentration was defined as follows:

$$\log_{10} \left( \lambda_{[NaCl]} \right) = \log \left[ \left( 1 - 10^{-\Delta} \right) 10^{-\left( \frac{[NaCl] - 0.5}{Z_{NaCl}} \right)^2} + 10^{-\Delta} \right]$$
(5)

Where the  $Z_{NaCl}$  is the amount of added sodium chloride concentration (wt/wt), which leads to a tenfold reduction of  $\delta$  value observed at a sodium chloride concentration corresponding to the minimal concentration in BHI ([NaCl]<sub>opt</sub> =0.5 % (wt/wt));  $\Delta$  is the maximal decimal reduction of the resistance, expected by a sodium chloride addition.

The biological destruction values related to concentration of temperature of incubation was defined as follows:

$$\log_{10}(\lambda_{T}) = \begin{cases} \frac{2.(T_{c} - T_{opt})}{Z_{T}^{2}}.(T - T^{*}) & T \leq Tc \\ \left(\frac{T - T_{opt}}{Z_{T}}\right)^{2} - \frac{(T_{c} - T_{opt})(2T^{*} - T_{c} - T_{opt})}{Z_{T}^{2}} & T > Tc \end{cases}$$
(6)

Where  $T_{opt}$  is the optimal temperature for survival (only observed for pH stress);  $T_c$  is the junction temperature between the two functions of the model. Regardless the type of stress,  $Z_T$  is the difference of temperature, which leads to a tenfold reduction of  $\delta$  value observed at the optimal temperature for bacterial survival for temperature which is over  $T_c$ . The global model (equations 2, 3, 4, 5 and 6) has two types of parameters: the  $\delta^*$  parameter is characteristic of resistance in given conditions (pH\*=4.0, [AH]\*=0M, [NaCl]\*=0.5%, T\*=12°C); and the parameters characteristic of the bacterial sensitivity linked to the variations of environmental conditions.

Primary and secondary models can be expressed as follows:

 $Y_i = f(x_i, \theta) + \varepsilon_i$ 

Where  $Y_i$  is the observed response as the decimal logarithm of N or the decimal logarithm of  $\delta$ , f is the regression function (equation 1 for primary modelling),  $x_i$  is the explicative factor. Vectors of parameters of models  $\theta$  were estimated by minimization of the sum of square of the residual values ( $\varepsilon_i$ ) defined by:

$$C(\theta) = \sum_{i=1}^{n} \left( Y_i - f(x_i, \theta) \right)^2 \tag{9}$$

Where n is the number of data. The minimum  $C(\theta)$  values were computed by nonlinear fitting module (lsqcurvefit, MATLAB 6.1, Optimization toolbox, The Math-works).

#### 2.2.4. Prediction of bacterial survival in food and its evaluation

The confidence limits of parameters and confidence bands of predictions were estimated by using the bootstrap percentile method (12). However, the confidence bands of prediction kinetics can be obtained by other methods, as Monte Carlo method (16). In order to take the experimental errors of kinetics into account, bootstrap of each kinetic was made. The appropriate residuals of each kinetic were drawn with replacement. 500 bootstrap set of primary parameters (log<sub>10</sub> $N_0$ ,  $\alpha$ ,  $\delta_1$ ,  $\delta_2$ ) and one p values were obtained for BHI broth and the

studied food which was modified or not. Bootstrap  $\delta_I$ ,  $\delta_2$  values for different conditions and media were used to fit the secondary model. The bootstrap estimated values of secondary parameters, were used to predict the  $\delta_I$ ,  $\delta_2$  values for modified product. Secondary observed residual were drawn with replacement and added the  $\delta_I$ ,  $\delta_2$  predicted values. The bootstrap values of  $N_0$  and  $\alpha$  which were estimated for food products and bootstrap prediction of parameters  $\delta_I$ ,  $\delta_2$  values were used to simulate bacterial inactivation kinetics in modified food. At this kinetic, primary residual obtained from food were drawn with replacement to give the error of enumeration. This step was repeated 500 times. 500x500 survival kinetics were obtained for each modified product. For each times observed for modified product kinetics, the quartiles 2.5% and 97.5% of the calculated  $\log_{10}N_0$  were taken to give the inferior and superior limits. These points were linked to give an approximation of the confidence bands of the predicted kinetics. To validate the assumption made and the models, less than 5% of the points must fall outside the confidence bands.

This method gave the errors on the predicted values of  $\delta$ , of the predicted kinetics. Accuracy factors and bias factors were also used to evaluate the quality of prediction of the model (4, 24). They were calculated as follows:

$$A_{f} = \exp\left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (y_{predicted} - y_{observed})^{2}}{n}}\right)$$
(10)  
$$B_{f} = \exp\left(\frac{\sum_{i=1}^{n} (y_{predicted} - y_{observed})}{n}\right)$$
(11)

Where n is the number of predicted values ( $Y_{predicted}$ ) or of observed values ( $Y_{observed}$ ). These criterions were used for  $\delta$ , the predicted or observed values where  $log_{10}(\delta)$  according to the secondary modelling. They were also used for kinetics. In this case, the predicted or observed values where  $log_{10}(N_{(t)})$  (16).

The percent discrepancy (%Df) and percent bias (%Bf) were calculated as follows:

$$\% Df = (Af - 1).100\%$$
(12)  
$$\% Bf = \text{sgn}(\ln(Bf)).(\text{exp}|\ln(Bf)| - 1).100\%$$
(12)  
Where  $\text{sgn}(b) = \begin{cases} +1 & if \quad b > 0\\ 0 & if \quad b = 0\\ -1 & if \quad b < 0 \end{cases}$ 

If %Bf > 0, the model predicts lower inactivation than the observation; if %Bf = 0, the model predicts perfectly the observation; if %Bf > 0, the model predicts faster inactivation than the observations.

## 2.3. Results

#### 2.3.1. <u>Estimation of parameters related to bacterial sensitivity or</u> <u>resistance in food</u>

Firstly, fits of the primary model were done. 138 kinetic curves of inactivation for *Listeria monocytogenes* and 136 kinetic curves for *Salmonella typhimurium* were previously acquired in brain heart infusion (BHI) at different pH, lactic acid concentration, sodium chloride concentration and temperature of incubation (9). The primary model was fit on the set of all kinetic data in BHI and in food product (table 2). The  $N_0$  and  $\alpha$  values are characteristic of the inoculum size preparation and of the physiological state of the bacterial population respectively (9).  $3 \log_{10} N_0$  and one  $\alpha$  values were estimated for kinetics in the three studied products from kinetics which were obtained at 12°C in non modified product. The  $\alpha$  value was estimated at 0.82 and 1.17 for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*, respectively. For each condition in BHI or in food,  $\delta_1$  and  $\delta_2$  values were estimated. These sets of estimated parameters in foods are presented table 2. The fitted kinetics related to non-modified food product which were incubated at 12°C were presented (figure 1). The goodness of fit parameter (RMSE) for the secondary model was equal to 0.167 and 0.173 for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* respectively.



Figure 1 Calibration kinetics in food products for Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium, observed points ( $\bullet$ ) and model fit (-)

In a second step, the secondary global model was fitted (estimated parameters, tables 3 and 4). According to previous work (9), three  $\delta$  values related to the bacterial survival in BHI were estimated. Three  $\delta^*$  values related to bacterial resistance observed in fresh and mild goat's cheese, salad dressing low calorie and cheese brine were estimated for each sub population. This estimation, which was called calibration, was allowed by the assumption of the conservation of the bacterial sensitivity between BHI and food products. In other words, Z and  $\Delta$  values estimated from experiments of cultures in BHI were inputs for the estimation of  $\delta^*$  related to foodstuffs. In a safety way, retained values were those which were estimated at single stress conditions in BHI. For the mild goat's cheese, the four factors were taken into account. The sodium chloride concentration was not taken into account in modelling for salad dressing and cheese brine. The first one did not contain this additive and the second contained 35 % (wt/wt) of sodium chloride which was over the studied sodium chloride concentration in BHI (25% (wt/wt)). The estimated parameters were presented in tables 3 and 4 with their quartiles 2.5% and 97.5%, which were obtained by the percentile Bootstrap method (see above).

Table 2 Estimated parameters of the primary model fitted on challenge test kinetics for <u>Listeria monocytogenes</u> and <u>Salmonella typhimurium</u>

Food	Trial	Li	steria m	onocytogen	es	Salmonella typhimurium				
products	11141	Log <sub>10</sub> N <sub>0</sub>	α	$\delta_1$ (h)	$\delta_2(h)$	Log <sub>10</sub> N <sub>0</sub>	α	$\delta_1$ (h)	$\delta_{2}(h)$	
e	calibration			526.37	526.37			281.12	532.85	
chees	HCl addition			188.46	188.46			62.81	62.81	
Fresh and mild goat's	Lactic acid addition	6.07		110.08	110.08	6.02		80.78	115.36	
	Salt addition	0.07		948.62	1350.30	0.02		159.46	611.67	
	Warm			195.65	195.54			76.75	136.75	
	Cold			738.55	1073.90			536.70	878.54	
nie	calibration			4.12	16.88	6.71		30.69	73.06	
w calc	HCl addition		0.82				1.17	7.67	21.67	
ssing lo	Lactic acid addition	6.43		25.28	25.28			6.78	18.50	
d dres	Warm			2.51	4.85			6.15	19.94	
Sala	Cold			24.46	38.08			47.45	79.68	
	calibration			2217.30	2727.50			950.17	1868.40	
brine	HCl addition	5.07		164.77	894.32	5.20		172.45	1050.70	
Cheese	Lactic acid addition	5.27		229.84	1108.70	5.20		268.29	1254.40	
	Warm			524.82	524.82			58.73	264.78	

Table 3	Estir	nated pai	rameters o	of th	le gl	lobal	seconda	ry model	and	the	2.5%	and	97.5%
quartiles	(in	squared	brackets)	of	the	boo	tstrapped	estimate	d pa	ıram	eters .	for .	<u>Listeria</u>
<u>monocyto</u>	ogene	<u>25</u>											

Characteristic values of $Log_{10}(\delta)$	$\delta_1(\mathbf{h}) = \delta_2(\mathbf{h})$								
	2.	93	3.	09					
LOg <sub>10</sub> ( <i>O BH1 pH*</i> , 0 [AH], 0.5% [NaCl],T*)	[2.92	;2.95]	[3.10;3.24]						
$L_{0}g_{10}(\delta RH,RH=5.2,0)$ (AH) 0.5% [NGCI] T*)	4.	14	4.	50					
20810(0 BH pH-5.2, 0 [AH], 0.5% [NaCI], 1.)	[3.91	;3.97]	[3.80;4.05]						
$Log_{10}(\delta_{BHIDH=7.0,0})$ [AH] 20% [NaC]] T*)	2.	07	2.68						
	[2.08	;2.11]	[2.68;2.71]						
$Log_{10}(\delta^*_{cheese})$	4. [4.00:/	11	4.	US .2 071					
	[4.09,2	+.1933] 47	[5.39	,3.87] 06					
$\text{Log}_{10}(\delta^*_{\text{salad dressing}})$	[2 89	+7 ·3 62]	5. [3.15]	·3 54]					
	[2.0) 4	,5.02] 85	[J.15 4	,5.54j 87					
$\text{Log}_{10}(\delta^*_{\text{brine}})$	[4 83	·4 971	[4 36	·4 66]					
Parameters characterising	Simple	stress <sup>(a)</sup>	Double	stress <sup>(b)</sup>					
bacterial sensitivity	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)					
		-2()	5 29	-2()					
pH <sub>opt</sub>		[5.0	0;5.37]						
7	-1.86	-1.88	-1.82	-2.09					
$Z_{pH acid}$	[-1.96;-1.70]	[-1.98;-1.67]	[-1.87;-1.60]	[-2.22;-1.94]					
7			3.27	3.71					
∠pH basic			[3.16;3.95]	[3.69;49.52]					
$Z_{pH basic}$	18.62	20.36	102.17	77.75					
	[17.92;19.00]	[28.60;41.71]	[96.41;103.94]	[35.70;78.23]					
$L_{0}g_{10}(\delta_{INIGCH})$ -A	2.84	3.09							
	[2.83;2.86]	[3.04;3.14]	0.0	0.01					
Δ			0.26	0.31					
			[0.23; 0.30]	[0.29;0.78]					
$Z_{NaCl}$ (% (wt/wt))			0.50 [5 75:6 59]	5.07 [4 72·7 09]					
			[5.75,0.57] 01 74	[4.72,7.07]					
$Z_T$ (°C)		[23]	7·25 73]						
		[]	0.80						
$T_{opt}$ (°C)		[7.9	2;11.97]						
$T_{\alpha}(0,C)$		. 1	9.06						
1 <sub>c</sub> (°C)		[20.227;28.434]							
Number of kinetics	141								
Root mean square error		(	).167						

(a) Simple stress related data were acquired in BHI modified for only one factor (pH, or acid lactic concentration or sodium chloride concentration)

(b) Double stress related data were acquired in BHI modified for two factors (9)

Table 4	Esti	imated	parameters	of of	the	global	secona	lary	model	and	the	2.5%	and	97.5%
quartiles	(in	square	ed brackets	) of	the	bootst	rapped	esti	mated	parai	mete	rs for	Saln	<u>10nella</u>
typhimur	<u>ium</u>													

Characteristic values of $Log_{10}(\delta)$	$\delta_{I}$ (h)		$\delta_2$ (h)		
	3.07		3.16		
LOG10(0 BH1 pH*, 0 [AH], 0.5% [NaC1], 1*)	[3.0	4;3.09]	[3.14;3.19]		
$Log_{10}(\delta_{BHI}) = 5.2 \text{ oracle of SMC11}(3.3)$	50 (	3.66	3.39		
= • 810(• bin pii-5.2, 0 [Aii], 0.570 [NaCi], 1 )	[3.6	1;3.65]	[3.35;3.41]		
$Log_{10}(\delta_{BHI_{D}H=7.0,0})$ [AH] 0.5% [NaCI] T*)	50.7	3.70 4.2.001	3.80		
	[3.74;3.99]		[3.60;3.76]		
$Log_{10}(\delta^*_{cheese})$	[2 0	5.04 [2.07:2.10]		2.95	
	[2.9	7,5.10] 8.16	[2.91;2.97]		
$Log_{10}(\delta *_{salad dressing})$	[3.08	5.10 [3.08:3.182]		2.03 [2 78:2 85]	
	[5.00	3 50		3 40	
$\text{Log}_{10}(\delta^*_{\text{brine}})$	[3.44:3.53]		[3.35:3.42]		
Parameters dependant			$\sum_{i=1}^{n} b_i = b_i$		
of bacterial sensitivity	Simple stress (%)		Double stress (*)		
	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)	$\delta_{l}$ (h)	$\delta_2$ (h)	
nH	5.90				
priopt	[5.86;5.98]				
Zerthereid	-2.24	-2.35	-1.92	-1.93	
2рн аста	[-2.30;-2.21]	[-2.41;-2.32]	[-1.97;-1.89]	[-2.00;-1.90]	
$Z_{nH \ basic}$			1.78	2.40	
	50.1(	104.20	[1.60;1.81]	[2.26;2.47]	
$Z_{AH}$ (mM)	59.10	194.20	I/./4	21.15	
	2 17	1.04	1 17	[20.06,21.90]	
$\Delta$	[2,17]	[0 99.1 15]	[1 16:1 22]	0.82 [0.90:0.95]	
	9 96	11 91	635	9 53	
$Z_{NaCl}$ (% (wt/wt))	[8.35:9.41]	[9.71:10.36]	[5.18:6.44]	[8.84:9.13]	
7 (00)	24.13				
$Z_T(C)$	[23.83;24.51]				
$T_{opt}$ (°C)	10.47				
	[10.32;10.99]				
$T_{-}(^{\circ}C)$	22.44				
	[21.67;22.46]				
Number of kinetics	139				
Root mean square error	0.173				

(a) Simple stress related data were acquired in BHI modified for only one factor (pH, or acid lactic concentration or sodium chloride concentration)

(b) Double stress related data were acquired in BHI modified for two factors (9)

# 2.3.2. Prediction of inactivation in food

For each food product, challenge tests were made in physicochemical conditions different from those which were used for calibration (table 1). Corresponding kinetic data and the observed bacterial resistance ( $\delta$ ) were compared to predictions in order to validate the tested model, and the assumption of conservation of bacterial sensitivity between synthetic medium (BHI) and food products. The fresh and mild goat's cheese was chosen for validation of all secondary modules (pH, lactic acid and sodium chloride concentration, temperature). Salad dressing low calories and cheese brine were chosen to check if the influence of temperature and influence of an acidification are similar in foodstuff and BHI. For practical reasons, challenge tests in brine at 4°C and challenge test in acidified salad dressing contaminated with Listeria were not acquired (duration of kinetics too long, or to short). As mentioned above, the predictions of inactivation kinetics were made by inputting the N<sub>0</sub> value estimated from each challenge test. The  $\alpha$  value was estimated from the kinetics of the three foods. The bacterial resistance to stress was predicted by the calculation of  $\delta_1$  and  $\delta_2$  for each modified product or modified temperature of storage. The accuracy, bias factors and their associate percent were calculated for each predicted  $\delta$  value (tables 5 and 6). The confidence bands, predicted kinetic and observed points were plotted to have a graphic validation of the predicted kinetics (figure 2 and 3).

For prediction at different temperature of storage, more than 98% of observed data were in the confidence bands, except for cheese brine contaminated with *Salmonella typhimurium* where 75% of points were outside. For this case the simulated curve predicted inactivation slower than observed (%*Bf*=-99.43). The accuracy factors of the resistance which was expressed by  $\delta$  values had for median value 1.13 (%*Df*=12.66) with minimum equal to 1.00 (%*Df*=0.28) and maximum equal to 1.99 (%*Df*=99.43). This higher value was obtained for  $\delta_1$  value of cheese brine contaminated with *Salmonella typhimurium*. The Bias factors median was equal to 0.95, equivalent to a percent bias of -5.16%, which means a slight tendency to predict faster inactivation than observed.

The pH of food was changed by hydrochloric acid, sodium hydroxide or lactic acid addition. Independently of the used additives, lower or higher pH involves lower or higher lactic acid concentration of undissociated form. The quality of prediction regarding acidified products was fair but not perfectly validated, with 7% of data outside the confidence bands excluding cheese brine challenge tests. In fresh and mild goat's cheese and salad dressing low calories, the model related to acidification was validated for five among eleven cases, with less of 5% of the points outside de confidence bands. Prediction of bacterial inactivation in a modified product with hydrochloric acid appeared to be less accurate than acid lactic addition, their accuracy factors medians were 1.22 (%Df=21.53) and 1.37 (%Df=37.10) respectively. The simulation of acid addition to food overestimated slightly bacterial inactivation with median bias factors equal to 1.14 (%Bf=13.88) for fresh and mild goat's cheese and 1.30 (%Bf=30.12) for salad dressing low calories. In pH modified cheese brine, the simulation of bacterial inactivation with large confidence bounds.

The addition of 15% (wt/wt) salt in fresh and mild goat's cheese did not increase the inactivation as predicted. In BHI broth, the bacterial resistance decreased with addition of salt from 0% to 10% and was stable from 10% to 20%. But in cheese, the amount of sodium chloride concentration to 15.2% caused a decrease of the inactivation rate. The prediction could not be validated: 77% of data were located outside the confidence bands. It was also reflected by high accuracy and bias factors.

		Listeria monocytogenes		Salmonella typhimurium	
		$Af_{\delta l} (\% Df_{\delta l})$	$Af_{\delta 2}(\%Df_{\delta 2})$	$Af_{\delta l} (\% Df_{\delta l})$	$Af_{\delta 2}(\%Df_{\delta 2})$
Fresh and mild goat's cheese	HCl addition	1.47 (46.97%)	1.23 (23.25%)	1.35 (35.05%)	1.29 (28.81%)
	Lactic acid addition	1.19 (19.15%)	1.01 (1.35%)	1.09 (8.60%)	1.26 (26.36%)
	Salt addition	1.67 (66.93%)	2.06 (106.29%)	6.12 (512.05%)	3.00 (200.46%)
	Warm	1.18 (18.06%)	1.18 (18.05%)	1.055 (5.47%)	1.08 (7.73%)
	Cold	1.23 (23.25%)	1.05 (4.74%)	1.03 (3.38%)	1.10 (9.56%)
Salad dressing	HCl addition	1.06 (6.17%)	1.65 (65.46%)	1.69 (69.24%)	1.39 (39.14%)
	Lactic acid addition			1.13 (12.63%)	1.24 (23.73%)
	Warm	1.46 (46.43%)	1.06 (5.57%)	1.20 (19.83%)	1.05 (4.85%)
	Cold	1.52 (51.8%)	1.00 (0.28%)	1.13 (12.55%)	1.31 (31.05%)
Cheese brine	HCl addition	1.25 (25.18%)	1.70 (70.11%)	1.23 (22.88%)	1.43 (42.82%)
	Lactic acid addition	1.19 (19.32%)	1.61 (60.95%)	1.29 (28.69%)	1.40 (39.75%)
	Warm	1.03 (3.06%)	1.13 (12.76%)	1.99 (99.43%)	1.39 (39.32%)

*Table 5 Accuracy factors and percent discrepancy (in brackets) for <u>Listeria monocytogenes</u> and <u>Salmonella typhimurium</u> survival in food product.* 

*Table 6 Bias factors and percent bias for <u>Listeria monocytogenes</u> and <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u> survival in food product.* 

		Listeria monocytogenes		Salmonella typhimurium	
		$Bf_{\delta l}$ (% $Bf_{\delta l}$ )	$Bf_{\delta 2}(\% Bf_{\delta 2})$	$Bf_{\delta l}$ (% $Bf_{\delta l}$ )	$Bf_{\delta 2}(\% Bf_{\delta 2})$
Fresh and mild goat's cheese	HCl addition	1.47 (46.97%)	1.23 (23.25%)	1.35(35.05%)	0.78 (-28.81%)
	Lactic acid addition	1.19 (19.15%)	0.99 (-1.35%)	1.09 (8.60%)	0.79 (-26.36%)
	Salt addition	1.67 (66.93%)	2.06 (106.29%)	6.12 (512.05%)	3.00 (200.46%)
	Warm	1.18 (18.06%)	1.18 (18.05%)	0.95 (-5.47%)	0.93 (-7.73%)
	Cold	0.81 (-23.25%)	0.95 (-4.73%)	0.97 (-3.38%)	0.91 (-9.56%)
Salad dressing	HCl addition	0.94 (-6.17%)	0.60 (-65.46%)	1.69 (69.24%)	1.39(39.14%)
	Lactic acid addition			0.89 (-12.63%)	0.81 (-23.73%)
	Warm	1.46 (46.43%)	1.06 (5.57%)	0.83 (-19.83%)	0.95 (-4.85%)
	Cold	1.52 (51.8%)	1.00 (-0.28%)	0.89 (-12.55%)	0.76 (-31.05%)
Cheese brine	HCl addition	1.25 (25.18%)	1.70 (70.11%)	1.23 (22.88%)	1.43 (42.82%)
	Lactic acid addition	1.19 (19.32%)	1.61 (60.95%)	1.29 (28.69%)	1.40 (39.75%)
	Warm	0.97 (-3.06%)	0.89 (-12.76%)	0.50 (-99.43%)	0.72 (-39.32%)



Figure 2 Confrontation between challenge test in food product (•) and prediction of <u>Listeria</u> <u>monocytogenes</u> survival (—), approximation of confidence bands ( $\alpha = 0.05$ ) (--).



Figure 3 Confrontation between challenge test in food product (•) and prediction of <u>Salmonella typhimurium</u> survival (—), approximation of confidence bands ( $\alpha = 0.05$ ) (--).

# 2.4. <u>1. Discussion</u>

The low temperatures belonging to the range of growth of the microorganisms cannot be considered as responsible for the cellular death, but associated to a lethal stress, they increase the bacterial survival (14). The protective role of low temperatures is strongly linked to the mechanisms of resistance inducted by stationary phase, or by crossed protection. These mechanisms of resistance against acid or osmotic stress are expressed by the modification of the composition of the membrane (7, 27), the variation of structure of proteins or DNA (18), the expression of proteins of cold stress and by the accumulation of compatible solutes (1). A function, describing the influence of temperature on bacterial resistance, was previously proposed from inactivation experiments in synthetic media (BHI) (9). It yielded a very good prediction of bacterial resistance in food product, regardless of the nature of the bacterial stress (acid, osmotic), the physiology of the bacteria (Listeria and Salmonella), and the composition of the product. This result shows that the bacterial resistance was modulated in the same manner in food product and in BHI, and then that the bacterial sensitivity is conserved regardless of the inoculated media. In studied foods, the inactivation rates were quite different: very fast in salad dressing, medium in fresh and mild goat's cheese, and slow in cheese brine. The intensity of stress, its origin, and the medium of inactivation did not seem to play any part in bacterial sensitivity to temperature of incubation. This result allows the use of a single function with 3 parameters to characterize the bacterial sensitivity according to temperature of incubation and regardless the type of stress or the type of media (synthetic or food products).

The secondary model regarding the acidification of media involves two modules. One function is linked to changes of protons concentration, and the second to changes of concentration of protonated form of weak acid. These functions are linked to two different physiological mechanisms leading to cell death. The bacterial wall is permeable to the undissociated form of weak acid (AH). These are going to dissociate in the cytoplasm according to their pKa, leading to a decrease of the internal pH by the liberation of protons, an increase of the cellular turgescence and an inhibition of the metabolic ways by the accumulation of the anionic form (A) (5, 11, 13, 19). The predictions according to the two modules were close to observed data, confirming the assumption of the conservative sensitivity of bacterial resistance to acid stress between synthetic media such as BHI and food product. The sensitivity to pH was estimated in BHI: in this study the cell death was the result of an exposition to low pH (HCl addition into BHI). However, the sensitivity to undissociated acid lactic form was estimated from inactivation kinetic data acquired at pH 5.5 and at different lactic acid concentration. This last estimation might over estimate a little the lethal efficacy of the protonated acid form. pH equal to 7.0 would be preferred, but at this pH, the amount of lactic acid might be very important to be able to observe bacterial inactivation.

The quality of prediction of the inactivation rate by an addition of 14% of sodium chloride in fresh and mild goat's cheese was poor. In BHI, the inactivation rate was increased by salt (amount); while in food, the bacterial resistance was not affected for *Salmonella typhimurium* or doubled for *Listeria monocytogenes*. The addition of salt or decreased water activity has different effects according to investigated range regardless of the (used) medium. From 0 to 10% (wt/wt) of sodium chloride or from 1.00 to 0.92 of water activity, the bacterial resistance decreases; and stills practically stable for water activity over 0.80 (17, 21, Shahamat, 1980 #54). In a range of low water activity, a decline of water activity protects the microorganisms from inactivation (6, 28). From the results of this work, this protective effect of sodium chloride addition might be observed for medium water activity close to 0.80. The

increase of bacterial resistance was not predicted by the implemented secondary modelling. In future model development, this behavior should be integrated.

Furthermore, adopted procedure for estimating the  $\delta^*$  value, which is characteristic of the bacterial resistance in a given food product was not powerful. A slight deviation of the calibration  $\delta$  values affected highly the estimated  $\delta^*$  values. It could explain the lower quality of prediction regarding acidification. The validation data (related to modified products) have to be added in the estimation of  $\delta^*$  value in order to give more accurate and robust estimates of  $\delta^*$  for each studied food products, and then allowing the prediction of bacterial resistance as functions of pH, acid lactic concentration or temperature of incubation.

The chosen approach of secondary modelling is close to "gamma concept" of Zwietering (32) or cardinal models of Rosso with modules reflecting the influence of studied physico-chemical factors, and one parameter reflecting the specificity of the media (25, 32).. This method requires an important work for secondary modelling in synthetic media but it can be easily extrapolated to numerous food products by the acquisition of few new kinetic data (23).

#### Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Agriculture via the "Aliment Qualité Sécurité" program, in association with the national program in predictive microbiology Sym'previus. The PhD fellowship of Louis Coroller was granted by the UNIR (Ultra-propre, Nutrition, Industrie, Recherche) association and the National Association of Technical Research.

# References

- 1. Abee, T., and J. A. Wouters. 1999. Microbial stress response in minimal processing. International Journal of Food Microbiology 50:65-91.
- 2. Augustin, J. C. 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for Listeria monocytogenes. International Journal of Food Microbiology 56:29-51.
- 3. Augustin, J. C., and V. Carlier. 2000. Modelling the growth rate of Listeria monocytogenes with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. International Journal of Food Microbiology 56:53-70.
- 4. Baranyi, J., C. Pin, and T. Ross. 1999. Validating and comparing predictive models. International Journal of Food Microbiology 48:159-166.
- 5. Bearson, S., B. Bearson, and J. W. Foster. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiology Letters 147:173-180.
- 6. Beuchat, L. R., and A. J. Scouten. 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of Salmonella and Escherichia coli O157:H7 on alfalfa seeds. Journal of Applied Microbiology 92:382-95.
- 7. Carty, S. M., K. R. Sreekumar, and C. R. H. Raetz. 1999. Effect of Cold Shock on Lipid A Biosynthesis in Escherichia coli. induction at 12 °C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. J. Biol. Chem. 274:9677-9685.
- 8. Cerf, O. 1977. Tailing of survival curves of bacterial spores, a review. Journal of Applied Bacteriology 42:1-19.
- 9. Coroller, L., I. Leguerinel, E. Mettler, and P. Mafart. 2006. Modelling the non-thermal inactivation of Listeria monocytogenes or Salmonella typhimurium as a function of environmental factors: pH, lactic acid concentration, sodium chloride concentration and temperature. Applied Environmental Microbiology submitted AEM00876-06.
- 10. Coroller, L., I. Leguerinel, E. Mettler, N. Savy, and P. Mafart. 2006. A general model for fitting various shapes of microbial inactivation curves. Applied Environmental Microbiology submitted.
- 11. Cotter, P. D., and C. Hill. 2003. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67:429-453.
- 12. Efron, B., and R. J. Tibshirani. 1993. Confidence intervals based on bootstrap percentiles, p. 168-177. In M. o. S. a. A. Probability (ed.), An Introduction To The Bootstrap. Chapman-Hall.
- 13. Foster, J. W. 1999. When protons attack: Microbial strategies of acid adaptation. Current Opinion in Microbiology 2:170-174.
- 14. Gawande, P. V., and A. A. Bhagwat. 2002. Protective effects of cold temperature and surface-contact on acid tolerance of Salmonella spp. Journal of Applied Microbiology 93:689-696.
- 15. Geeraerd, A. H., C. H. Herremans, and J. F. V. Impe. 2000. Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. International Journal of Food Microbiology 59:185-209.
- Geysen, S., B. E. Verlinden, A. H. Geeraerd, J. F. Van Impe, C. W. Michiels, and B. M. NicolaI. 2005. Predictive modelling and validation of Listeria innocua growth at superatmospheric oxygen and carbon dioxide concentrations. International Journal of Food Microbiology 105:333-345.
- 17. Hajmeer, M., I. Basheer, C. Hew, and D. O. Cliver. 2006. Modelling the survival of Salmonella spp. in chorizos. International Journal of Food Microbiology 107:59-67.
- 18. Hurme, R., and M. Rhen. 1998. Temperature sensing in bacterial gene regulation what it all boils down to. Molecular Microbiology 30:1-6.
- 19. Ita, P., and R. Hutkins. 1991. Intracellular pH and survival of Listeria monocytogenes Scott A in tryptic soy broth containing acid, lactic and hydrochloric acids. Journal of Food Protection 54:15-19.
- 20. Le Marc, Y., V. Huchet, C. Bourgeois, J. Guyonnet, P. Mafart, and D. Thuault. 2002. Modelling the growth kinetics of Listeria as a function of temperature, pH and organic acid concentration. International Journal of Food Microbiology 73:219-237.
- 21. Miller, A. J. 1992. Combined water activity and solute effects on growth and survival of Listeria monocytogenes Scott A. Journal of Food Protection 55:414-418.
- 22. Peleg, M., and M. B. Cole. 1998. Reinterpretation of Microbial Survival Curves. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 38:353-380.
- 23. Pinon, A., M. Zwietering, L. Perrier, J.-M. Membre, B. Leporq, E. Mettler, D. Thuault, L. Coroller, V. Stahl, and M. Vialette. 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.
- 24. Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive References models in food microbiology. Journal of Applied Bacteriology 81:501-508.
- 25. Rosso, L., J. Lobry, S. Bajard, and J. Flandrois. 1995. Convenient Model To Describe the Combined Effects of Temperature and pH on Microbial Growth. Applied Environmental Microbiology 61:610-616.
- 26. Rosso, L., J. R. Lobry, and J. P. Flandrois. 1993. An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. Journal of Theoretical Biology 162:447-463.
- 27. Russell, N. J. 1984. Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. Trends in Biochemical Sciences 9:108-112.
- 28. Sperber, W. 1983. Influence of water activity on food borne bacteria. Journal of Food Protection 46:142-150.
- 29. Valdramidis, V. P., A. H. Geeraerd, K. Bernaerts, F. Devlieghere, J. Debevere, and J. F. Van Impe. 2004. Accurate Modelling of Non-Loglinear Survival Curves. Bulletin of the international dairy federation:97-110.
- 30. van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International Journal of Food Microbiology 74:139-59.
- 31. Whiting, R. C., and R. L. Buchanan. 1993. A classification of models in predictive microbiology—a reply to K.R. Davey. Food Microbiology 10:175-177.
- 32. Zwietering, M. H., T. Wijtzes, J. C. De Wit, and K. van't Riet. 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. Journal of Food Protection 55:973-979.

# **Discussion générale**

A côté des travaux visant à quantifier la croissance bactérienne ou l'inactivation thermique des spores, le domaine de la microbiologie prévisionnelle de loin le moins exploré reste incontestablement celui de l'inactivation non thermique liée à des conditions environnementales inhospitalières : températures défavorables, acidité du milieu, salinité élevée etc. Les principaux freins pouvant expliquer cette lacune peuvent se résumer au moins en partie de la manière suivante :

- lenteur de la décroissance demandant parfois des manipulations dont la longueur peut dépasser plusieurs semaines, ce qui limite le nombre d'espèces ou de souches étudiées,

- allures extrêmement variables des courbes de survie, défiant la plupart du temps les modèles primaires existant, ce qui explique que les auteurs se contentent généralement de quantifier la vitesse d'inactivation par des paramètres frustes tels que le  $t_{4D}$ ,

- présence d'interactions très marquées entre facteurs, compliquant notablement la modélisation secondaire, pour peu que l'on souhaite éviter l'approche polynomiale.

Malgré ses limites évoquées plus bas, notre travail apporte une contribution significative au champ de l'inactivation non thermique de deux espèces bactériennes pathogènes particulièrement sensibles.

L'approche modélisatrice proposée dans ces travaux, utilisation du modèle double de Weibull associée à une modélisation secondaire modulaire comporte de nombreux avantages que nous avons déjà évoqués, simplicité et interprétabilité des paramètres, différenciation de deux sous-populations aussi bien au niveau de leur résistance qu'au niveau de leur sensibilité, estimation de la concentration bactérienne à tout temps de traitement ... Malgré tout, il reste quelques points à étudier et à renforcer à court terme.

Le modèle primaire basé sur une double distribution de Weibull de la résistance au stress permet de caractériser avec seulement trois paramètres la résistance bactérienne en fonction de l'état physiologique des cellules bactériennes. Les paramètres  $\delta_1$  et  $\delta_2$  caractérisent la résistance des deux sous-populations, et le paramètre  $\alpha$  caractérise la répartition de la population vis-à-vis de sa résistance au stress. Cette parcimonie rend possible la modélisation secondaire, les trois paramètres évoluant de façon cohérente et nette en fonction des conditions environnementales précédant le stress ou durant celui-ci. Les autres modèles primaires ne permettent pas de décrire toutes les formes typiques de courbes de survie. De plus, au moins quatre de leurs paramètres évoluent en fonction des conditions d'inactivation, et le plus souvent de manière plus ou moins anarchique suivant la qualité des données et le jeu de données. Cette observation a conduit longtemps à calculer un  $t_{nD}$ , seule réponse faisant l'objet d'une modélisation secondaire.

La relative parcimonie du modèle double de Weibull repose sur l'hypothèse de la stabilité du paramètre p en fonction de l'intensité du stress ou l'état physiologique de la population. Cette hypothèse ne semble pas pouvoir être confirmée par nos résultats puisque seulement 50% des cinétiques valident l'hypothèse. Et pourtant, le fait d'utiliser une seule valeur de p indépendante des conditions physiologiques ou des conditions de stress, permet d'obtenir une évolution plus « propre » des trois paramètres  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  et  $\alpha$ , sans pour autant que la qualité d'ajustement s'altère sensiblement pour les courbes où la valeur p était initialement estimée à des valeurs très différentes pouvant aller jusqu'à 4. Même si la fixation de p est largement adoptée et recommandée dans le cas du modèle primaire de Weibull, elle n'a pas été confirmée de façon statistique (Peleg et Penchina, 2000; Fernandez *et al.*, 2002; Mafart *et al.*, 2002; van Boekel, 2002; Couvert *et al.*, 2005; Hajmeer *et al.*, 2006). La difficulté tient au

fait que, même lorsque l'hypothèse d'une indépendance de p vis-à-vis des facteurs environnementaux est statistiquement rejetée, aucune tendance claire liant les valeurs de p aux dits facteurs ne peut être détectée.

De plus, il apparaît souvent que les valeurs de  $\delta_1$  caractérisant la sous-population la plus sensible soient supérieures à la valeur de  $\delta_2$  caractérisant la sous-population la plus résitante. Nous pouvons l'observer aussi bien au niveau de l'ajustement primaire, qu'au niveau secondaire par le biais de l'estimation des  $\delta^*$  ou des valeurs prédites de  $\delta$ . Au niveau primaire, cette surestimation de la valeur de  $\delta_1$  est généralement observée dans le cadre de courbes aux formes simples. Sur de telles courbes, nous pouvons avoir également des sous estimations de  $\delta_I$ . Par exemple, pour les concentrations élevées en chlorure de sodium, les formes des courbes de survie sont simples, les valeurs estimées de  $\delta_1$  devraient donc être égales à celles de  $\delta_2$ , mais elles sont largement inférieures (Chapitre 3, figure 6). Il est évident que des courbes biphasiques peu marquées voire simples ne rendent pas possible une bonne discrimination des deux sous-populations et donc une estimation fiable des paramètres  $\delta_1$  et  $\delta_2$ par un ajustement sans contraintes. L'utilisation d'un modèle surparamétré pour ce type de courbes et la simplicité de la méthode de régression sont à l'origine de ces mauvaises estimations des paramètres primaires. La mise en place dans l'algorithme, ou dans la modélisation, d'un dispositif de commutation automatique du modèle complet vers le modèle simple Weibull en fonction de l'allure de la courbe, permettrait sans doute d'éviter ce type d'aberration.

Au niveau secondaire, les valeurs des  $\delta^*$  caractéristiques de la résistance des souspopulations dans des conditions de référence en milieu synthétique ou en aliment font parfois l'objet d'estimations aberrantes. C'est le cas par exemple, dans le cadre du stress dû à l'acide lactique pour *Salmonella* à pH 5,2 (Chapitre 3, tableau 2, figure 5), ou encore en fromage, en vinaigrette et en saumure pour cette même espèce (Chapitre 4, tableau 4). Nous pouvons aussi observer cette inversion des valeurs de  $\delta$  pour les valeurs prédites en milieu synthétique à de fortes concentrations en acide lactique à pH 4,0 pour *Listeria*. Si ces erreurs peuvent découler d'une mauvaise estimation primaire, elles sont surtout engendrées par une mauvaise estimation des paramètres de sensibilité. Par contre, à de faibles concentrations en l'acide lactique pour *Salmonella* à pH 5,2 (Chapitre 3, figure 5), il s'agit d'une zone où l'inactivation est improbable et donc, où le modèle est sans objet.

Ces estimations aberrantes des paramètres ou des prédictions secondaires sont moins fréquentes lors de la régression globale avec l'intégration des cinétiques en aliment (Chapitre 3, tableaux 6 et 7; Chapitre 4, tableaux 3 et 4). L'insuffisance de niveau dans le plan d'expérience semble être en cause. Cette carence de niveau est compensée par la régression globale ou l'addition de nouvelles données comme celle en produit alimentaire. En tout état de cause, de nouveaux plans d'expérience pourraient être acquis permettant de renforcer l'information disponible. Les plans expérimentaux réalisés sont loin d'être optimaux, ils ont été construits essentiellement pour connaître la réponse bactérienne sur de larges plages de conditions environnementales. Les nouveaux plans devront être optimisés en adaptation aux différents modèles proposés (Bernaerts *et al.*, 2005; Gauchi, 2005).

Afin de résoudre ces différents problèmes, une régression en une étape emboîtant modèles primaire et secondaires aurait pu être réalisée (Fernandez *et al.*, 2002; Valdramidis *et al.*, 2004). Dans notre étude nous nous sommes contentés de faire une régression classique en deux étapes, primaire puis secondaire. Le modèle primaire a été ajusté sur l'ensemble des cinétiques de survie. Ainsi, sur les n courbes obtenues à partir de i préparations d'inoculum, i  $N_0$ , n  $\delta_1$  et n  $\delta_2$ , i  $\alpha$  et une valeur de p ont été estimées. Puis, les valeurs caractéristiques de la résistance  $\delta^*$  et les paramètres de sensibilités sont estimés par la régression secondaire pour chaque sous-population, soit 32 paramètres pour l'ajustement global prenant en compte l'influence du pH, de la concentration en acide lactique, la concentration en chlorure de sodium et la température pour quatre environnements différents (Chapitre 4, tableaux 3 et 4).

La régression en une seule étape associe les modèles primaires et secondaires dans une seule fonction. L'ensemble des paramètres estimés se compose alors de i  $N_0$ , i  $\alpha$ , un p, et des 32 paramètres secondaires ( $\delta^*$ ,  $pH_{opt}$ ,  $Z_{pH}$ ,  $Z_{AH}$ ,  $Z_{NaCl}$ ,  $\Delta$ ,  $Z_T$ ). La régression en une étape a de nombreux avantages. Elle permet de minimiser le nombre de paramètres à estimer, dans notre cas de 2n paramètres, soit pour 140 courbes une réduction de 280 paramètres. Mais elle permet surtout de minimiser les erreurs d'ajustement, de réduire l'erreur sur les estimées, et de diminuer la corrélation entre les différents paramètres.

Dans le cadre d'une régression en deux étapes, deux régressions non linéaires où la variance est considérée homogène, sont utilisées. Les hypothèses d'homogénéité, l'homoscédaticité de la variance et la normalité des résidus sont vérifiées aussi bien pour les résidus primaires que secondaires. Concernant la régression en une étape, l'hypothèse de la variance homogène ne peut être vérifiée. En effet, l'erreur sur  $\delta$  pour les différentes conditions de stress n'est pas prise en compte par le simple emboîtement du modèle primaire et du modèle secondaire. La variance doit augmenter avec le temps d'exposition au stress, et par conséquent avec la diminution du nombre de cellules bactériennes survivantes. Avec peu de courbes primaires de bonnes qualités, dont les vitesses d'inactivation dévient peu du modèle secondaire proposé, la régression non linéaire en une étape en considérant la variance homoscédastique et homogène peut ne pas poser de problème (Fernandez *et al.*, 2002). Mais dans notre cas avec plus de 140 courbes primaires pour chaque espèce, la régression utilisée doit impérativement se baser , par exemple, sur une somme pondérée des carrés des écarts, ou consister en une régression non linéaire hétéroscédastique, nécessitant une modélisation de la variance.

L'utilisation de cette technique pourrait être très utile pour résoudre les problèmes d'estimations au niveau primaire des  $\delta_1$  et  $\delta_2$  évoqués ci-dessus, pour diminuer l'erreur et l'incertitude qui existe sur les estimations de  $\delta_1^*$  et  $\delta_2^*$ , mais aussi sur l'estimation des paramètres de sensibilité. D'autre part, la procédure en une seule étape pourrait permettre de tester l'hypothèse de la stabilité du paramètre p en fonction de l'intensité du stress ou l'état physiologique de la population. Généralement pour tester cette hypothèse, deux modèles primaires sont comparés courbes par courbes, le premier modèle avec un p ajusté par cinétique et l'autre sur l'ensemble des cinétiques. Comme nous l'avons observé l'hypothèse est rejetée pour un peu moins de 50% des courbes. Avec une seule étape de régression, nous pourrions tester l'hypothèse de la stabilité de la valeur p en comparant un modèle dont les paramètres primaires seraient i  $N_0$ , i  $\alpha$ , p, accompagnés des différents paramètres secondaires  $(\delta^{*}, pH_{opt}, Z_{pH}, Z_{AH}, Z_{NaCl}, \Delta, Z_{T})$ , à un modèle comportant comme paramètres primaires i  $N_{0}$ , i  $\alpha$ , n p, associés aux paramètres secondaires ( $\delta^*$ ,  $pH_{opt}$ ,  $Z_{pH}$ ,  $Z_{AH}$ ,  $Z_{NaCl}$ ,  $\Delta$ ,  $Z_T$ ). Cette comparaison permettrait d'apprécier non seulement la parcimonie (diminution de n-1 paramètres) et la qualité d'ajustement, mais aussi les bénéfices au niveau secondaire engendrés par cette simplification (évolution plus nette des paramètres secondaires).

L'emploi de la régression en une étape aurait également des répercutions très favorables dans le cadre de la validation des modèles en aliment. En effet, la réduction de l'erreur et de l'incertitude sur les différents paramètres estimés conduirait à diminuer celles de la prédiction. Cette diminution aurait la vertu renforcer la validation de l'hypothèse de la conservation de la sensibilité bactérienne en aliment. La largeur des bandes de confiances pourrait se trouver réduite. Dans ce but, la méthode basée sur le bootstrap pour obtenir les

bandes de confiance pourrait être améliorée, notamment en tenant compte de la variance des prédictions boostrappées.

### **Références :**

- Bernaerts, K., K. P. M. Gysemans, T. Nhan Minh, et J. F. Van Impe. 2005. Optimal experiment design for cardinal values estimation: guidelines for data collection. International Journal of Food Microbiology 100: 153.
- Couvert, O., S. Gaillard, N. Savy, P. Mafart, et I. Leguerinel. 2005. Survival curves of heated bacterial spores: effect of environmental factors on Weibull parameters. International Journal of Food Microbiology 101: 73-81.
- Fernandez, A., J. Collado, L. M. Cunha, M. J. Ocio, et A. Martinez. 2002. Empirical model building based on Weibull distribution to describe the joint effect of pH and temperature on the thermal resistance of Bacillus cereus in vegetable substrate. International Journal of Food Microbiology 77: 147-153.
- Gauchi, J. P. 2005. Optimal statistical designs for the accurate estimation of the parameters of a growth rate model for *Listeria monocytogenes*. INRA, Jouy-en-Josas, France.
- Hajmeer, M., I. Basheer, C. Hew, et D. O. Cliver. 2006. Modeling the survival of *Salmonella spp.* in chorizos. International Journal of Food Microbiology 107: 59-67.
- Mafart, P., O. Couvert, S. Gaillard, et I. Leguerinel. 2002. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of Weilbull frequency distribution model. International Journal of Food Microbiology 72: 107-113.
- Peleg, M., et C. M. Penchina. 2000. Modelling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40: 159-172.
- Valdramidis, V. P., A. H. Geeraerd, K. Bernaerts, F. Devlieghere, J. Debevere, et J. F. Van Impe. 2004. Accurate Modelling of Non-Loglinear Survival Curves. Bulletin of the international dairy federation 392: 97-110.
- van Boekel, M. A. J. S. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. International Journal of Food Microbiology 74: 139-59.

## **Conclusion et Perspectives**

Dès le début du vingtième siècle, l'utilisation de simples modèles log-linéaires (cinétique d'ordre un pour l'inactivation, relation de Bigelow (1921) pour l'effet de la température sur la vitesse de destruction thermique) a permis d'optimiser les barèmes de stérilisation ou de pasteurisation. Plus récemment, les modèles décrivant le développement bactérien en fonction de la température de stockage de l'aliment ont été mis en oeuvre pour prévoir et optimiser les durées de vie des denrées. Ces outils sont le plus souvent utilisés visà-vis d'un risque sanitaire, mais peuvent être également appliqués pour réduire la flore d'altération. Progressivement ces modèles ont été étendus à d'autres facteurs, comme par exemple le pH, l'activité de l'eau, la présence d'additifs, l'atmosphère de stockage, et les interactions entre les différents facteurs considérés. L'amélioration constante de ces outils conduit à une meilleure connaissance et maîtrise des risques alimentaires. La modélisation de l'efficacité des procédés de conservation des denrées basés sur un stress non thermique pose plus de problème. En effet, si dans le cadre des traitements thermiques l'utilisation de modèles log-linéaires est satisfaisante dans la plupart des cas, les courbes de survie adoptent des formes variables et non linéaires en fonction non seulement de la nature du stress ou de son intensité, mais aussi en fonction de l'état physiologique des cellules bactériennes. Une telle complexité a limité la quantification de la diminution des populations pathogènes suite à un stress acide ou osmotique. En suivant les trois étapes maintenant classiques de la Microbiologie prévisionnelle, modélisation primaire, secondaire et tertiaire, nous avons en partie répondu à ce problème en posant les bases d'une démarche modélisatrice de l'inactivation non thermique.

Malgré le grand nombre de modèles primaires proposés dans la littérature pour décrire l'inactivation bactérienne, aucun ne permet de décrire toutes les allures rencontrées de courbes de survie. Nous avons proposé un modèle primaire basé sur une double distribution de Weibull de la résistance bactérienne au stress. Ce modèle permet de caractériser la résistance d'une population bactérienne en fonction de l'état physiologique des organismes qui la constituent, et en fonction de la nature et de l'intensité du stress appliqué. Il permet ainsi de distinguer deux sous-populations : une plus résistante et l'autre plus sensible. Cette distinction peut apparaître manichéenne, mais il n'en est rien comme en témoigne l'exemple de la figure 1. Les valeurs plus probables de résistance au stress de ces deux sous-populations sont différentes, égales à 2,8 jours pour une sous-population et 5,7 jours pour l'autre, mais leurs distributions se chevauchent sur une grande partie. Ainsi, certains microorganismes peuvent se situer indifférentment dans l'une ou l'autre des sous-populations.

Par ailleurs, à partir de courbes de survie complexes, sigmoïdales ou biphasiques avec latence, ce modèle permet de simuler dans un sens sécuritaire en se focalisant sur la proportion plus résistante de la population étudiée. Cette attitude est d'autant plus justifiée que les cellules les plus adaptées possèdent non seulement une plus grande résistance, mais aussi une sensibilité moindre aux variations de stress. Pour quantifier l'impact d'un stress sur une population bactérienne au cours des étapes de fabrication ou de stockage, il convient donc de considérer uniquement la population la plus adaptée.

Le fait de pourvoir discriminer deux sous populations est aussi un atout dans l'étude de la variabilité intraspécifique ou interspécifique. En effet, la plupart des études concernant la diversité de la résistance au stress consiste à préparer les inoculums des différentes souches suivant la même méthodologie (milieu, température, temps d'incubation, ...), puis à étudier le nombre de réduction décimale ou le pourcentage de survivant après un stress donné. Or lorsque le stress est appliqué, l'état physiologique des populations bactériennes issues de la préparation de chaque souche peut être différent. L'utilisation du modèle double de Weibull permettrait de s'affranchir de l'état physiologique de la population bactérienne, et d'étudier à la fois la résistance maximale de chaque souche et leur sensibilité aux variations environnementales.



Figure 1 Fonction de densité de probabilité de la résistance bactérienne au stress décrite par un double modèle de Weibull. La sous-population la plus sensible est décrite par (— —), et la sous-population la plus résistante est décrite par (---). Les paramètres utilisés pour cette distribution sont  $N_0=10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup>,  $\alpha=1$ ,  $\delta_1=4$  jours,  $\delta_1=8$  jours et p=2.

Le modèle secondaire global obtenu est de forme modulaire, et repose sur l'hypothèse selon laquelle les paramètres de sensibilité (Z et  $\Delta$ ) restent stables et indépendants de la composition ou de la structure des aliments. Cette hypothèse n'a pas été infirmée par nos expériences de validations du modèle. Quant au paramètre  $\delta^*$ , il caractérise la résistance des cellules en conditions standards (pH 4, 0mM d'acide lactique, 0,5% (m/m) de chlorure de sodium, 12°C) et joue le rôle de paramètre « fourre tout » en ce sens qu'il rend compte, de manière globale, de tous les facteurs « mineurs » non intégrés dans la modélisation : « effet matrice » de l'aliment, présence éventuelle de molécules protectrices ou inhibitrices, etc...

Les modules proposés sont complètement empiriques, mais ils ont l'avantage de comporter des paramètres facilement interprétables graphiquement ou biologiquement, comme les optima de survie, ou le paramètre « Z » commun en traitement thermique et qui est ici étendu à de nouveaux facteurs et de nouveaux types de stress. De plus ces modules paraissent robustes, ils ont été développés à partir de deux bactéries physiologiquement très différentes. De plus, les travaux présentés au chapitre 2 nous permettent d'envisager une modélisation secondaire de l'adaptation des microorganismes au stress, via les paramètres  $\delta_1$  et  $\alpha$  qui évoluent de manière cohérente en fonction de l'état physiologique des organismes.

Compte tenu des différences marquées, d'une part entre les deux espèces bactériennes étudiées, et d'autre part entre les produits testés, la simulation des cinétiques d'inactivation d'une population bactérienne soumise à un stress en aliment stocké à différentes températures est encourageante. La sensibilité vis-à-vis de la température est conservée entre milieu synthétique et aliment.

		Listeria monocytogenes		Salmonella typhimurium	
		Sous population plus sensible	Sous population plus résistante	Sous population plus sensible	Sous population plus résistante
Valeurs caractéristiques de $\text{Log}_{10}(\delta(h))$	$\mathrm{Log}_{10}(\delta^{*}{}_{BHI})^{(a)}$	2,93 [2,92; 2,94]	3,10 [3,1; 3,23]	3,04 [3,00; 3,05]	3,15 [3,13; 3,18]
	$Log_{10}(\delta^{*}_{fromage})^{(b)}$	3,74 [3,68; 3,79]	3,78 [3,67; 4,06]	3,50 [3,44; 3,54]	3,38 [3,35; 3,41]
	$Log_{10}(\delta^{*}_{vinaigrette})^{(b)}$	2,08 [2,07; 2,09]	2,68 [2,67; 2,70]	3,84 [3,75; 4,00]	3,71 [3,61; 3,78]
	$Log_{10}(\delta^*_{saumure})^{(b)}$	4,05 [3,99; 4,12]	3,64 [3,53; 3,80]	2,94 [2,88; 3,01]	2,80 [2,77; 2,83]
Paramètres caractérisant la sensibilité bactérienne	$\mathrm{pH}_{\mathrm{opt}}$	5,10 [4,9;5,28]		5,91 [5,87;5,98]	
	$Z_{pH acide}$	-1,78 [-1,93;-1,63]	-1,78 [-1,93;-1,62]	-2,30 [-2,38;-2,27]	-2,38 [-2,44;-2,34]
	$Z_{AH}$ (mM)	23,30 [21,86;24,76]	42,72 [26,66;50,88]	83,88 [74,67;98,13]	205,45 [195,42;230,04]
	$Z_T$ (°C)	23,8 [21,4;26,2]		24,1 [21,3;26,9]	
	$T_{opt}$ (°C)	9,0 [6,0;12,0]		10,5 [7,2;13,9]	
	T <sub>c</sub> (°C)	20,8 [19,8;26,4]		22,0 [19,2;24,8]	
	Nombre de cinétiques Ecart type	149 0,168		148 0,176	
(a) l'e	effet du sel est pris e (b) l'effet du sel n'	n compte : est pas pris en co	<i>pH</i> *=4,0 ; 0 mpte : <i>pH</i> *=	M [AH], 0 % [Na 4,0 ; 0 M [AH],T*	<i>Cl],T</i> *=12°C ≔12°C

Tableau 1 Paramètres du modèle global (cf. Chapitre 4), caractéristiques de la résistance bactérienne au sein de différente matrice et de la sensibilité bactérienne.

Les résultats concernant le stress acide sont de moins bonne qualité et ne peuvent pas être complètement validés (cf. chapitre 4). Il ne semble pas que les modules « pH » ou « acide lactiques » soient en cause. En milieu synthétique, ces modules se montrent satisfaisants en présence ou absence de facteur de stress additionnel, correspondant à la présence ou l'absence d'interactions entre les facteurs étudiés. Par contre, les valeurs caractérisant la sensibilité bactérienne vis-à-vis de la concentration en acide lactique non dissocié sont peut être la cause de la mauvaise prédiction observée en aliment. En effet, pour des raisons pratiques, le paramètre de sensibilité à l'acide  $Z_{AH}$  n'est pas estimé au pH optimal de survie mais à pH=5,5. Comme nous l'avons observé, la sensibilité à la présence d'acide sous forme non dissociée est de 3 à 10 fois plus élevée à pH = 4,0 qu'à pH=5,5. La valeur de ce paramètre estimée à pH 5,5, utilisée pour les simulations, pourrait surestimer l'effet des formes non dissociées de l'acide lactique.

En ce qui concerne le stress osmotique, l'effet protecteur qui peut être observé à très basse activité de l'eau en milieu synthétique, est remarqué en aliment dès 17% de sel (m/m). La prise en compte de cet effet dans la prédiction de l'inactivation bactérienne nécessite une étude plus approfondie pouvant porter, dans un premier temps, sur l'étude des interactions des facteurs pH, acide faible et chlorure de sodium, puis s'étendre plus spécifiquement à l'influence de l'activité de l'eau avec différents dépresseurs.

L'approche modulaire adoptée dans ces travaux pour décrire l'influence de l'intensité du stress sur la résistance bactérienne permet non seulement l'intégration de nouveaux modules comme par exemple un module interaction, mais surtout une extrapolation à de nouveaux aliments grâce à l'acquisition d'un minimum de données. Si l'estimation de  $\delta^*$  est réalisée ici à partir d'une seule condition (aliment en conditions natives à 12°C), afin d'avoir une estimation plus fiable il est nécessaire de prendre en compte les données en aliment modifié ou à d'autres températures de stockage. Cette étape ne peut bien sûr être réalisée qu'une fois les modules validés (cf. Chapitre 4). Le tableau précédent illustre cette démarche. Une estimation finale peut être réalisée en prenant en compte les cinétiques en bouillon cœur cervelle et les cinétiques en aliment. Pour les premières, nous tiendrons compte de l'influence du pH, de la concentration en acide lactique non dissocié, en chlorure de sodium et de la température ; et pour les cinétiques en aliments, nous tiendrons compte des mêmes facteurs, excepté la concentration en sel qui n'a pas été validée au sein des denrées. De manière plus générale, il serait judicieux que l'ensemble des données disponibles soit intégré progressivement pour augmenter le potentiel prédictif du modèle du point de vue de la précision et de la diversité des milieux.

De manière plus générale, la démarche proposée dans ce travail permet de prendre en compte les phénomènes d'inactivation non thermique dans une analyse quantitative des risques. Dans les travaux de ce type, l'inactivation thermique et la croissance des microorganismes sont généralement prises en compte. La majorité des cas de présence de *Listeria monocytogenes* ou *Salmonella typhimurium* au sein de denrées en cours de fabrication ou à la sortie d'usine, fait état de faibles concentrations. De nombreux épreuves microbiologiques montrent des phénomènes de décroissance (fromages à pâte fraîche, saucissons, etc..) qui ne sont pas pris en compte dans les modèles actuels, au mieux la croissance est considérée nulle en conditions défavorables. L'apport du modèle global développé pourrait être très satisfaisant pour quantifier le devenir de ces populations bactériennes.

Malgré son aspect simpliste, le modèle secondaire permet des applications pédagogiques. En effet, les aliments peuvent être comparés selon leur pouvoir inactivant par le biais des  $\delta^*$ . Par exemple en conditions standards de pH (pH 4), de concentration en acide

lactique non dissocié (0M) et de température (12°C), les milieux étudiés dans ce travail sont classés du moins au plus favorable à l'inactivation comme suit :

- la vinaigrette, le fromage frais, le bouillon cœur cervelle (BHI) et la saumure pour *Salmonella typhimurium*,
- la saumure, le fromage frais, le bouillon cœur cervelle (BHI) et la vinaigrette pour *Listeria monocytogenes*.

Le  $\delta^*$  de la vinaigrette est plus faible que celui de la saumure, pouvant aller jusqu'à 2 logarithme décimal de différence pour *Listeria monocytogenes*. Cela correspond donc à une résistance de *Listeria monocytogenes* 100 fois plus importante en saumure qu'en vinaigrette indépendamment de la température, du pH ou de la concentration en acide lactique de ces produits.

De plus, tout comme le « *concept gamma* » (Zwietering *et al.*, 1992), les modules permettent de classer les facteurs selon leur potentiel inactivant par rapport aux conditions de références. Le facteur au plus fort potentiel aura la valeur de destruction biologique la plus forte. Par exemple pour les trois produits étudiés, stockés à 25°C, le classement des facteurs étudiés par ordre croissant de potentiel inactivant est : acide lactique non dissocié, température, pH pour *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium*.

Une fois l'utilisation du modèle double de Weibull validée, elle devrait être étendue à l'ensemble du domaine de l'inactivation des microorganismes. En effet, les courbes de survie sigmoïdales ou biphasiques avec une décroissance non linéaire, apparaissent également avec d'autres microorganismes et d'autres stress que ceux étudiés dans une multitude de travaux. Il serait intéressant d'appliquer le modèle de survie basé sur une double distribution de Weibull et une approche secondaire modulaire pour caractériser et quantifier l'impact des procédés comme les traitements thermiques ou pasteurisations, hautes pressions, champs électriques pulsés, radiations, utilisations de peptides antimicrobiens ou désinfectants sur différents organismes : cellules bactériennes sous formes végétatives ou sporulées, de champignons ou de phages.

Il est clair que ce travail, malgré ses acquis substantiels et intéressants, ne constitue qu'une étude préliminaire dans un domaine encore fort peu exploré. De nombreuses pistes complémentaires restent ouvertes :

- amélioration du système de modélisation secondaire avec en particulier prise en compte des interactions,
- estimation des paramètres en une seule étape combinant modèle primaire et modèles secondaires. Une telle démarche ne sera possible qu'après étude de la variance de la réponse globale,
- étude, au sein d'une même espèce, d'un panel représentatif de souches permettant d'évaluer la variabilité intraspécifique. A plus long terme, il serait utile de sélectionner, pour chaque espèce, une souche de référence parmi les plus nocives et les plus résistantes, servant de base à calculs standards,
- études de nouvelles espèces,
- en ce qui concerne le stress acide, étude de l'influence de la nature de l'anion acide,
- en ce qui concerne le stress osmotique, étude de l'effet protecteur des fortes concentrations en chlorure de sodium, et de l'effet de la nature du dépresseur,
- exploration plus poussée des effets d'adaptation avant stress,
- etc...

### **Références :**

- **Bigelow, W. D. 1921.** The logarithmic nature of thermal death curves. Journal of Infectious Diseases 29: 528-539.
- **Zwietering, M. H., T. Wijtzes, J. C. De Wit, et K. van't Riet. 1992.** A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. Journal of Food Protection 55: 973-979.

#### Etude des facteurs non thermiques agissant sur la décroissance microbienne et modélisation

La Microbiologie prévisionnelle, permettant de quantifier l'évolution de population bactérienne, s'est principalement développée dans les domaines de la croissance et de l'inactivation thermique. Cependant, il reste de nombreux points non maîtrisés, par exemple le lent déclin d'une population durant sa conservation, durant un stress acide ou osmotique ne peut pas être prédit actuellement de façon fiable.

Afin de permettre la description du déclin au cours du temps, de population de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella typhimurium* en fonction des conditions environnementales, une démarche classique en trois étapes est proposée :

- (i) Un modèle reposant sur une double distribution de Weibull de la résistance bactérienne au stress est développé. Ce modèle dissocie deux sous populations : une plus sensible et l'autre plus résistante. Il permet de décrire l'évolution de l'effectif bactérienne dans le temps, et de caractériser la résistance de chaque sous population à la fois en fonction de l'état physiologique de la population bactérienne et en fonction de l'intensité du stress.
- (ii) Les influences sur la résistance bactérienne, du pH, de la concentration en acide lactique non dissocié, et en chlorure de sodium, sont modélisées avec prise en compte de la température dans une gamme non létale. Le modèle proposé comporte deux types de paramètres, caractérisant la sensibilité bactérienne aux variations environnementales ou reflétant la résistance d'une souche bactérienne dans un milieu donné.
- (iii) La sensibilité bactérienne ayant été précédemment étudiée en milieu synthétique, quelques cinétiques en aliment permettent d'étendre la prédiction de l'inactivation des populations bactériennes en fromage frais, vinaigrette et saumure.

*Mots clefs* : inactivation non thermique, stress acide, stress osmotique, température d'incubation, modélisation, Weibull, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* 

#### Study of the non-thermal factors acting on the microbial decrease and modelling

The predictive microbiology, quantifying the evolution of bacterial population, has been mainly developed in the fields of the growth and of the thermal inactivation. However, the slow decline of a population during storage of food products, during an acid stress or an osmotic stress can not be predicted in a reliable way.

To allow the description of the decrease of the population of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* during time and according to the environmental conditions, a classical method in three steps was proposed:

- (i) A model based on a double distribution of Weibull of the bacterial resistance in the stress was developed. This model distinguishes two subpopulations, one more sensitive and the other one more resistant. It allows to describe the bacterial evolution according to time, and to characterize the resistance of each subpopulation according to the physiological state of the bacterial population and to the intensity of the stress.
- (ii) The influences on the bacterial resistance, of the pH, of the concentration of undissociated lactic acid, and of sodium chloride, were modelled with taking account of the temperature of incubation in a non lethal range. The model contains two types of parameters characterizing the bacterial sensibility linked to the environmental variations, or translating the specificity of the bacterial resistance according to the type of environment.
- (iii) The bacterial sensibility, which was previously studied in synthetic medium, some kinetics in food allow to spread the prediction of the inactivation of the bacterial populations in soft white cheese, salad dressing and brine.

Key words: non-thermal inactivation, acid stress, osmotic stress, temperature of incubation, modelling, Weibull, Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium